



⑩ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift

⑪ DE 100 41 541 A 1

⑪ Aktenzeichen: 100 41 541.5
⑪ Anmeldetag: 24. 8. 2000
⑪ Offenlegungstag: 14. 3. 2002

⑪ Int. Cl.?

C 07 K 16/00

C 07 K 14/435
A 61 K 38/17
C 07 H 21/00
C 12 N 15/63
C 12 N 15/13

DE 100 41 541 A 1

⑪ Anmelder:

Duchene, Michael, Dr., Wien, AT

⑪ Vertreter:

Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑪ Erfinder:

Duchene, Michael, Dr., Wien, AT; Binder, Marina, Wien, AT; Mahler, Vera, 91054 Erlangen, DE; Hayek, Brigitte, Wien, AT; Prozell, Sabine, 10407 Berlin, DE; Schöller, Matthias, 10247 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑪ Rekombinante Allergene aus der Motte *Plodia interpunctella*

⑪ Die Erfindung betrifft rekombinante Allergene p40 (Arginin kinase), p33 (Tropomyosin), p84 (Arylphorin) und p27 (eine Oxidoreduktase) aus der Dörrobstmotte *Plodia interpunctella*, deren Fragmente und abgeleitete rekombinante DNA-Moleküle, Vektoren und Wirtszellen, die diese rekombinanten DNA-Moleküle enthalten, sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen der beschriebenen Allergene und Fragmente.

DE 100 41 541 A 1

DE 100 41 541 A 1

Beschreibung

[0001] Die vorgestellte Erfindung befaßt sich insbesondere mit dem Problem der allergischen Reaktion auf Invertebratenproteine am Beispiel der Allergie gegen Proteine aus der Dörrobstmotte *Plodia interpunctella*. Sie beschreibt rekombinante Moleküle, die von vier Allergenen dieser Spezies abgeleitet sind und ihre Anwendung für Diagnose und Therapie von Allergien und die Detektion von Allergenen in der Umwelt des Menschen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Bis zu 20% der Bevölkerung der Industriestaaten leiden unter Typ I allergischen Symptomen (Rhinitis, Konjunktivitis, bronchiale Asthma) (Myamoto et al., 1992). Bei der Typ I Allergie bindet das Allergen an IgE-Antikörper auf der Oberfläche von Mastzellen. Das IgE ist an die hochaffinen Fc_ε-RI-Rezeptoren gebunden, die durch die zusätzliche Bindung der Allergene quervernetzt werden und damit der Mastzelle signalisieren, biologische Mediatoren wie zum Beispiel Histamin freizusetzen (Segal et al., 1977). In den vergangenen Jahren ist gezeigt worden, daß Allergene meist wasserlösliche Proteine sind, die in vielen Fällen in rekombinanter Form erzeugt werden können (Kraft et al., 1999). Noch vor wenigen Jahren wurde ausschließlich speziesspezifische Allergiediagnostik betrieben, bei der Gesamtextrakte natürlicher Allergenquellen, z. B. von Pollen oder Tierhaarextrakte als Antigen eingesetzt wurden. Diese Extrakte sind biochemisch nicht genau definiert, manchmal fehlen wichtige allergene Komponenten. Deshalb wird in den vergangenen Jahren in zunehmender Weise eine komponentenspezifische Diagnose (CRD, "component resolved diagnosis") mit Hilfe von gut definierten, rekombinanten Allergenen eingeführt (Valenta et al., 1999).

[0003] Während die Allergene außerhalb des Hauses meist mit Pflanzenpollen assoziiert sind, kommen im Haus mehr Allergene aus Tieren vor, sowohl von Schädlingen als auch von Haustieren. Bei den Schädlingen steht als Allergenquelle die Hausstaubmilbe, ein Spinnentier (Thomas und Smith, 1999) an erster Stelle. Besonders in den USA ist die Küchenschabe, ein flügelloses Insekt, auch als Allergenquelle wichtig (Rosenstreich et al., 1997; von Wijnen et al., 1997). Von beiden sind eine Reihe rekombinanter Allergene bekannt (Arruda et al., 1995; Thomas und Smith, 1999). Eine zusätzliche Allergenquelle im Haus sind Schimmelpilze, von denen in den letzten Jahren ebenfalls mehrere allergene Komponenten charakterisiert und für die Diagnostik eingesetzt wurden (Unger et al., 1999).

[0004] Diese Erfindung befaßt sich mit einer bisher kaum untersuchten Allergenquelle im häuslichen Bereich, den Motten. Bei den Motten handelt es sich um Insekten, um echte Schmetterlinge (Lepidoptera). Die Hauptvertreter sind *Plodia interpunctella*, die Dörrobstmotte, im englischen Sprachgebrauch "Indian meal moth" und *Tineola bisselliella*, die Kleidermotte, "webbing clothes moth". Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf *P. interpunctella*, allerdings sind die verschiedenen Mottenarten nah verwandt und deshalb ist zu erwarten, daß die Allergene der verschiedenen Mottenarten immunologisch kreuzreaktiv sind. Die Dörrobstmotte ist ein Nahrungsmittelparasit, sie wird hauptsächlich in der Küche gefunden und befallt trockene Nahrungsmittel wie Nüsse, Dörrobst, Schokolade, Hafer, Maismehl, Müesli. Es wird vermutet, daß die Dörrobstmotte aus Südamerika stammt. Sie ist der häufigste Nahrungsmittelschädling in den amerikanischen Haushalten und wurde deshalb im Mai 1999 vom Department of Environmental Health & Safety der Harvard Universität zum "Schädling des Monats" gewählt (http://www.uos.harvard.edu/ehs/hot_topics/pom_meal_moth.html). Auch in den deutschen Haushalten ist die Dörrobstmotte häufig (zum Beispiel: Vorratsschädling Nr. 1: die Dörrobstmotte. Sendung im Westdeutschen Rundfunk am 9. Mai 1997, von Michael Wiegert-Wegener). Abgestorbene Motten trocknen aus und landen typischerweise über den Hausstaub im Staubsauger. Dieser stößt große Mengen von winzigen Staubpartikeln aus, die auch Proteine der eingesaugten Insekten und damit potentielle Allergene enthalten.

[0005] Bisher ist noch von keinem Allergen aus irgendeiner Mottenspezies die Struktur aufgeklärt worden. Außerdem gibt es noch keine Publikation in der gesamten medizinischen Literatur (Medline), die sich mit der Dörrobstmotte im Zusammenhang mit Allergie beschäftigt. Dennoch gibt es eine kleine Zahl von Publikationen, die sich mit Allergien gegen andere Motten beschäftigen. Die Studie von Baldo und Panzani (1988) charakterisiert Extrakte verschiedener Insektenarten, darunter auch der Kleidermotte (*Tineola bisselliella*) mit IgE Immunoblots, enthält jedoch keine Primärstrukturen. Mehrere Publikationen berichten über allergische Reaktionen gegen Motten oder Seidenraupen bei beruflicher Exposition, zum Beispiel mit Seidenraupen (Komase et al. 1997, Suzuki et al., 1995, Wang et al., 1994), verschiedenen Schmetterlingen (Davis and Jenkins 1995), oder Mehlmothen (Storms et al., 1981).

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt vier rekombinante Allergene aus der wichtigsten Nahrungsmittelmotte für verschiedene medizinisch-diagnostische, umweltanalytische und therapeutische Zwecke zur Verfügung.

[0007] Homologe der vier beschriebenen Allergene sind in verschiedenen Spezies in der Vergangenheit bereits untersucht worden, es handelt sich um Arginin-kinasen, Tropomyosine, Arylphorine und eine Familie von Oxidoreduktasen. Tropomyosine sind als Allergene gut beschrieben (Reese et al., 1999) und auch zum Arylphorin als Allergen bei Schaben (*Periplaneta americana*) gibt es eine Publikation (Wu et al., 1996). In der Literatur sind auch schon einige Redox-Enzyme als Allergen beschrieben, hauptsächlich bei Pilzen und Pflanzen. Das Protein, das zu der gefundenen Oxidoreduktase aus der Motte am nächsten verwandt ist, ist die bakterielle Glukose-1-Dehydrogenase (Nagao et al., 1992), welche selbst nicht als Allergen bekannt ist. Die Arginin-kinase ist hingegen noch nicht als Allergen identifiziert worden, auch wenn in einer Publikation über ein Allergen Par f 1 aus der Garnele *Parapenaeus fissurus* Peptidsequenzen veröffentlicht wurden, die Sequenzähnlichkeiten zu Arginin-kinasen anderer Spezies aufweisen (Lin et al., 1993). Diese Ähnlichkeiten wurden jedoch in der Veröffentlichung nicht beschrieben. Die Arginin-kinase ist ein Enzym, das in Muskeln von Invertebraten Argininphosphat als Energie-Reservestoff bildet (Wyss et al., 1995). Auch bei Insekten wurde die Arginin-kinase in ihrer Primärstruktur aufgeklärt (Kucharski und Maleszka, 1998), allerdings nie als Allergen beschrieben.

[0008] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, daß die Dörrobstmotte, die in unseren Wohnungen sehr häufig als Nahrungsmittelschädling auftritt, auch eine Allergenquelle darstellen kann. Etwa die Hälfte der untersuchten Patientenreihen wiesen IgE gegen Mottenallergene auf. Die Erfindung stellt molekular genau definierte Reagenzien zur Verfügung, die von den beschriebenen Allergen p40 (Arginin-kinase), p33 (Tropomyosin), p84 (Arylphorin) und p27 (Oxidoreduktase) abgeleitet sind und einerseits eine exakt definierte und einfache in vitro und in vivo Diagnose und The-

DE 100 41 541 A 1

rapie der Allergie gegen Motten ermöglichen, andererseits den Nachweis von Mottenproteinen in Proben aus Haushalt, Schule oder Betrieb. Die Bezeichnungen der Allergene erfolgen in Anlehnung an ihre Molekulargewichte in kDa. [0009] Das Allergen p40 ist überdies ein neues Panallergen von wirbellosen Tieren, das auch in der Hausstaubmilbe, in der Schabe und in Meeresfrüchten gefunden wird und in diesen Spezies immunologisch verwandt mit p40 aus der Motte ist. So ist es denkbar, daß man sich durch den Kontakt mit Motten oder Milben sensibilisiert und in der Folge eine Nahrungsmittelallergie gegen Meeresfrüchte entwickelt. Für die Untersuchung einer solchen Kreuzsensibilisierung können das rekombinante p40 oder nahe verwandte Moleküle eingesetzt werden.

5

Beschreibung der Erfindung

[0010] Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, kodierend für ein allergenes Polypeptid, umfassend

10

- (a) eine der in SEQ ID No. 1, 3, 5 oder 7 dargestellten Sequenzen oder ein Fragment davon, welches für eine allergene Determinante davon kodiert.
- (b) eine von einer Sequenz gemäß (a) auf Grund einer Degeneration des genetischen Codes abweichende Sequenz,
- (c) eine Sequenz mit einer Identität > 80% zu einer der Sequenzen unter (a) und/oder (b) oder
- (d) eine Sequenz, die mit einer der Sequenzen gemäß (a), (b) und/oder (c) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

sowie eine Nukleinsäure, umfassend einen Bereich, der für ein Polypeptid mit einer in SEQ ID No. 2, 4, 6 oder 8 dargestellten Sequenz kodiert.

15

20

[0011] Ein erster Aspekt der Erfindung sind rekombinante DNA-Moleküle, die Nukleotidsequenzen (I) aufweisen, die Polypeptide kodieren, die die Antigenität der Allergene p40, p33, p84 oder p27 besitzen und aus Arthropoden isoliert sind, oder Nukleotidsequenzen (II), die mit solchen Nukleotidsequenzen (I) unter hochstringenten Bedingungen hybridisieren. Die rekombinanten DNA-Moleküle umfassen auch degenerierte Varianten dieser Nukleotidsequenzen.

25

[0012] Die rekombinanten DNA-Moleküle können auch Nukleotidsequenzen enthalten, die für Polypeptide kodieren, die antigene Kreuzaktivität und einen hohen Grad von Identität (vorzugsweise > 50%, insbesondere > 60 % oder > 75%) mit den Allergenen p40 p33, p84 und p27 aus Arthropoden besitzen, die in der Abb. 3-6 angegeben sind. Die Bezeichnungen p40, p33, p84 und p27 beziehen sich auf die Molekulargewichte der Polypeptide in kDa.

25

[0013] Der Ausdruck "Hybridisierung unter hochstringenten Bedingungen" gemäß der vorliegenden Erfindung wird wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 1.101-1.104) verwendet. Bevorzugt liegt eine hochstringente Hybridisierung gemäß der vorliegenden Erfindung vor, wenn nach Waschen für 1 Stunde mit 1 × SSC und 0,1% SDS bei 50°C, bevorzugt bei 55°C, mehr bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C, und mehr bevorzugt für 1 Stunde bei 0,2 × SSC und 0,1% SDS bei 50°C, bevorzugt bei 55°C, mehr bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet werden kann.

30

[0014] Der Ausdruck "Identität", wie hierin verwendet, kann durch die Gleichung $I(\%) = [1 - V/X] \times 100$ definiert werden, worin I die Identität in % ausgedrückt bedeutet, X die Gesamtzahl der Nukleobasen einer Nukleotidsequenz für p40, p33, p27 oder p84 ist und V die Anzahl an davon abweichenden Nukleobasen der zu vergleichenden Sequenzen ist.

35

[0015] Ein zweiter Aspekt der Erfindung sind rekombinante Expressionsvektoren oder rekombinante Klonierungssysteme, die eine Expressionskontrollsequenz aufweisen, die operativ mit einem der oben beschriebenen Moleküle verknüpft ist.

40

[0016] Ein dritter Aspekt der Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem rekombinanten Molekül oder einem Vektor nach dem ersten oder zweiten Aspekt der Erfindung transformiert ist.

45

[0017] Ein vierter Aspekt der Erfindung ist ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, das antigenes Epitope der p40, p33, p84 oder p27 Moleküle besitzt, die in den Aminosäuresequenzen von Abb. 3-6 enthalten sind. Das Protein oder Polypeptid kann dabei mit einem weiteren heterologen Polypeptid wie einer zellulosebindenden Domäne, β -Galaktosidase oder Glutathion-S-Transferase oder irgendeinem anderen Polypeptid fusioniert sein, das in prokaryotischen oder eukaryontischen Zellen exprimiert werden kann. Das Protein oder Polypeptid, das mit p40, p33, p84 oder p27 kreuzaktiv ist, kann dabei mit analytisch nachweisbaren Gruppen oder mit wasserlöslichen oder wasserunlöslichen Phasen konjugiert sein, die für die Durchführung des Nachweises von Antikörpern wie zum Beispiel IgA, IgD, IgE, IgG oder IgM geeignet sind. In den Aspekten der Erfindung, die sich mit in vitro Diagnostik befassen (siehe unten), können die Peptide der Erfindung a) an eine wasserunlösliche Phase durch physikalische Adsorption oder eine kovalente Bindung gekoppelt sein oder b) kovalent an eine analytisch nachweisbare Gruppe (Markierung) gekoppelt sein.

50

[0018] Die erfindungsgemäßen Polypeptide oder Fragmente davon, welche antigenen Determinanten enthalten, können als Immunogene zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt werden. Zur Herstellung von für die allergenen Determinanten spezifischen Antikörpern können Standardprotokolle herangezogen werden. Die Antikörper können dann z. B. zum Nachweis von Allergenen und/oder zur Therapie verwendet werden.

55

[0019] Die Erfindung umfaßt weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Nukleinsäure, einen Vektor, eine Zelle, ein Polypeptid oder einen Antikörper, wie hierin definiert, als Wirkstoff. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe sowie ggf. weitere Wirkstoffe enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann für diagnostische oder/und therapeutische Zwecke verwendet werden, insbesondere für Therapie oder/und Diagnose von allergischen Erkrankungen.

60

[0020] Der fünfte Aspekt der Erfindung ist eine in vitro Methode der Diagnose von Allergie gegen Arthropodenproteine, die die humoralen Antikörper bestimmt, die gegen die Arthropodenproteine gerichtet sind. Die umfaßten Allergien sind meistens gegen Insekten gerichtet. Die relevanten Antikörper sind meistens von der IgE Klasse, aber auch IgG-Antikörper können wichtige Information über die Allergie liefern. Im Normalfall umfaßt diese Methode den Kontakt einer Körperflüssigkeit aus einem Patienten mit einem Polypeptid der Erfindung. Die Mengenverhältnisse und Bedingungen

65

DE 100 41 541 A 1

werden so gewählt, daß sich Immunkomplexe zwischen dem Polypeptid und Antikörpern in der Probe in einer Menge ausbilden, die eine Funktion der Menge der Antikörper in der Probe ist. Der Immunkomplex wird dann mit einer der an sich bekannten Methoden gemessen. Etwas spezifischer ausgedrückt, eine bevorzugte Methode des fünften Aspekts der Erfindung besteht darin, eine Probe einer Körperfüssigkeit, die zum Beispiel IgE-Antikörper enthält, mit einem Polypeptid der Erfindung und einem Anti-IgE-Antikörper in Kontakt zu bringen, so daß sich ein IgE-Polypeptid-Anti-IgE-Immunkomplex bildet. Im Normalfall ist entweder das Polypeptid oder der Anti-IgE-Antikörper an eine feste Phase gekoppelt, die entweder unlöslich ist, oder im Testpuffer gefällt werden kann, so daß der Immunkomplex von dem Testpuffer getrennt werden kann. Der Detektionsschritt kann in diesen Varianten unter Verwendung einer analytisch nachweisbaren Gruppe (Markierung) ausgeführt werden, die entweder kovalent an den IgE-Antikörper gekoppelt ist (in diesem Fall ist das Polypeptid an die Festphase gekoppelt) oder an das Polypeptid (in diesem Fall ist der Anti-IgE-Antikörper an die Festphase gekoppelt). Wenn IgG-Antikörper bestimmt werden sollen, dann wird der Anti-IgE-Antikörper durch einen Anti-IgG-Antikörper ersetzt.

[0021] Ein sechster Aspekt der Erfindung ist eine Methode, die, vorzugsweise *in vitro*, eine zelluläre Reaktion, insbesondere eine Immunreaktion, auf das Polypeptid der Erfindung mißt und ein rekombinantes oder synthetisches Polypeptid wie im vierten Aspekt beschrieben verwendet, um die zelluläre Reaktion, insbesondere die Immunreaktion, zu stimulieren. Als zelluläre Reaktionen können die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten oder die Proliferation von T-Lymphozyten, gemessen durch Aufnahme von ^{3}H -Thymidin gemessen werden, ebenso die Stimulation von eosinophilen Granulozyten, gemessen durch die Freisetzung von Mediatoren, wie zum Beispiel dem eosinophilen kationischen Protein. Die Proben, die in den oben beschriebenen Methoden verwendet werden, sind meistens aus Blut gewonnen, wie zum Beispiel beparinisiertes Vollblut, Serum oder Plasma.

[0022] Ein siebenter Aspekt der Erfindung betrifft nur das p40 Allergen und besteht darin, durch Messung der Enzymaktivität des p40 Allergens und seiner Homologen, der Argininkinaseaktivität (EC 2.7.3.3), das Vorhandensein von Arthropodenallergenen in Proben aus der Umwelt des Menschen zu messen, beispielsweise in Staubproben aus Haushalt oder Betrieben. Die Argininkinase katalysiert die reversible Umwandlung von L-Arginin und Adenosintriphosphat (ATP) in N-Phospho-L-Arginin und Adenosindiphosphat (ADP). Für die Messung der Argininkinaseaktivität sind in der Literatur Standardmethoden beschrieben, die zum Beispiel das entstehende Produkt ADP indirekt messen (Anisik et al., 1975).

[0023] Der achte Aspekt der Erfindung besteht darin, mit Hilfe eines Immunoassays das Vorhandensein der p40, p33, p84 oder p27 Allergene oder deren Homologen in Proben aus der Umwelt des Menschen zu messen, beispielsweise in Staubproben aus Haushalt oder Betrieben. Der Immunoassay besteht darin, daß man einen monoklonalen Antikörper aus der Maus, der nach Standardmethoden gegen eines der Polypeptide der Erfindung gewonnen wird, oder ein Antiserum aus einem Wirbeltier, wie zum Beispiel, Kaninchen, Ziege, Schaf, Huhn, das gegen eines der Polypeptide der Erfindung gerichtet ist, mit der Umweltprobe in Kontakt bringt, die auf die p40, p33, p84 oder p27 Allergene oder deren Homologen getestet werden soll. Dabei ist der erste Antikörper oder das Antiserum typischerweise kovalent oder nichtkovalent an eine feste Phase gekoppelt, die Umweltprobe wird in wässriger Lösung oder in einem polaren Lösungsmittel gelöst angeboten. Nach einem Waschschritt wird das gebundene p40, p33, p84 oder p27 Allergen oder seine Homologen mit einem zweiten, markierten monoklonalen Antikörper oder einem Antiserum detektiert.

[0024] Bei diesem Verfahren kann insbesondere ein p40-Homolog aus einer beliebigen Spezies, besonders bevorzugt aus Motte oder Milbe, am meiste bevorzugt aus Hausstaubmilbe, ein p33-Homolog aus einer Schmetterlingsart, insbesondere Motte, ein p84 Homolog aus einer wirbellosen Spezies, insbesondere einer Schmetterlingsart oder/und ein p27-Homolog aus einer beliebigen Spezies, insbesondere von einer Arthropodenart bestimmt werden.

[0025] Der neunte Aspekt der Erfindung besteht darin, aus dem synthetischen oder rekombinanten Polypeptid der Erfindung ein Arzneimittel herzustellen, das zur Hypo sensibilisierung (Immunotherapy) von Patienten mit Allergie gegen p40, p33, p84 oder p27 oder deren Homologen eingesetzt werden kann.

[0026] Der zehnte Aspekt der Erfindung besteht darin, solche Fragmente oder Teileptide oder Multimere des Polypeptids der Erfindung herzustellen, die zwar ein oder mehrere Epitope, insbesondere IgE, IgG oder/und IgA-Epitope, der p40, p33, p84 oder p27 Allergene oder deren Homologen enthalten, aber nicht oder nur in einem stark eingeschränkten Maß zu einer anaphylaktischen Reaktion führen können. Multimere eines Allergens wirken oftmals weniger anaphylaktisch als Monomere, IgG und IgA-Epitope können eine geringere anaphylaktische Wirkung als IgE-Epitope aufweisen.

[0027] Diese Derivate der Polypeptide der Erfindung können zu einem Arzneimittel entwickelt werden, das entweder zur passiven Therapie des Effektororgans eingesetzt werden (Nase, Conjunctiva, Lunge), um einer Freisetzung von Mediatoren bei einer späteren Allergenexposition vorzubeugen, oder ebenfalls zu einer aktiven Immunotherapy im Sinne einer Hypo sensibilisierung.

[0028] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein diagnostisches Mittel zum Nachweis einer Allergie bei einem Patienten, wobei dieses Mittel ein Polypeptid oder einen Antikörper wie oben beschrieben, enthält.

[0029] Mit den Erkenntnissen der vorliegenden Erfindung ist es möglich, eine speziespezifische Allergiediagnostik unter Verwendung einer Motte, insbesondere der Dörrbrotmotte zu betreiben. Hierzu können die Dörrbrotmotte, Extrakte davon, wie etwa Gesamtextrakte oder einzelne Bestandteile, insbesondere in Form von Teilextrakten zur Bestimmung einer allergischen Reaktion, beispielsweise als Antigen eingesetzt werden.

[0030] Daneben ist es auch möglich, eine komponentenspezifische Allergiediagnostik durchzuführen, in dem Proben auf die einzelnen, oben beschriebenen Allergene untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist die Diagnose einer Argininkinase, insbesondere aus einer Motte oder aus einer Milbe, beispielsweise der Hausstaubmilbe, von besonders großem Interesse. Aber auch die anderen identifizierten Allergene sowie deren Homologen aus Arthropoden können für eine komponentenspezifische Allergiediagnostik herangezogen werden.

[0031] Auf Grund der hierin präsentierten Ergebnisse kann eine Argininkinase zur Herstellung eines Arzneimittels oder/und eines diagnostischen Mittels zur Behandlung von allergischen Erkrankungen oder/und zur Bestimmung von Allergenen verwendet werden. Bevorzugt wird hierzu eine Argininkinase aus einem Arthropoden, insbesondere aus Motte oder aus Milbe, z. B. Hausstaubmilbe eingesetzt bzw. ein Test auf das Vorhandensein einer solchen Argininkinase

DE 100 41 541 A 1

durchgeführt. Bei der Argininkinase handelt es sich bevorzugt um p40 oder eine Argininkinase, die zu p40 eine Identität von > 20%, insbesondere > 50%, bevorzugt > 70% und am meisten bevorzugt > 80%, aufweist und bevorzugt mit p40 konzentriert.

[0031] Grundsätzlich eröffnet sich somit eine breite Verwendung der erfundungsgemäß gefundenen Allergen und der dafür kodierenden Nukleinsäuren auf medizinisch-diagnostischem, umweltanalytischem und therapeutischem Gebiet. 5
[0032] Die Erfundung wird durch die folgenden Beispiele und die beigefügten Figuren weiter erläutert. Die Figuren zeigen:

[0033] Fig. 1: Immunoblotstreifchen mit Gesamtextract aus Larven der Dörrobstmotte, untersucht auf IgE in den Seren von 90 Patienten mit allergischen Beschwerden in Innenräumen (H1–H90, jeweils oberer Teil). Im jeweils unteren Teil wurden Immunoblotstreifchen mit rekombinantem p40 Allergen mit Hexahistidintag mit denselben Seren geprobt. Die Positionen von Molgewichtsmarkern sind auf der linken Seite in kDa angegeben. K ist die Pufferkontrolle ohne Zugabe von Serum. 10

[0034] Fig. 2: Immunoblotstreifchen mit Gesamtextract aus Larven der Dörrobstmotte (jeweils oberer Teil), untersucht auf IgE in den Seren von Patienten mit allergischen Beschwerden in Innenräumen plus atopischer Dermatitis (AH1–AH12), von Patienten mit Pollenallergie ohne angegebene Beschwerden im Haus (P1–P20) und von Normalpersonen (N1–N10). Im jeweils unteren Teil wurden Immunoblotstreifchen mit rekombinantem p40 Allergen mit Hexahistidintag mit denselben Seren untersucht. Die Positionen von Molgewichtsmarkern sind auf der linken Seite in kDa angegeben. K ist die Pufferkontrolle ohne die Zugabe von Serum. 15

[0035] Fig. 3: cDNA (SEQ ID No. 1) und davon abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID No. 2) des Allergens p40 aus *Plodia interpunctella*. 20

[0036] Fig. 4: cDNA (SEQ ID No. 3) und davon abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID No. 4) des Allergens p33 aus *Plodia interpunctella*. 25

[0037] Fig. 5: cDNA (SEQ ID No. 5) und davon abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID No. 6) des Allergens p84 aus *Plodia interpunctella*. 30

[0038] Fig. 6: cDNA (SEQ ID No. 7) und davon abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID No. 8) des Allergens p27 aus *Plodia interpunctella*. 35

[0039] Fig. 7: IgE-Immunoblot. Streifchen mit rekombinantem p40 Fusionsprotein mit einer Zellulose-bindenden Domäne wurden mit einer Auswahl der oben beschriebenen Seren getestet. Auf der rechten Seite sind die Molkulargewichtsmarker angegeben.

[0040] Fig. 8: Soforttypreaktionen beim Hauttest mit dem rekombinanten p40 Allergen mit Hexahistidintag. 40

a: Pricktest bei dem mottenallergischen Patienten AH11. Keine Hautreaktivität auf Konzentrationen Nr. 10 und 9. Quaddeln und Rötung bei den Konzentrationen Nr. 8 (3,12 ng/µl) bis Nr. 5 (25 ng/µl). Die höheren Konzentrationen wurden nicht mehr getestet. + + Positivkontrolle (Histamindihydrochlorid), – Negativkontrolle (0,9% NaCl). Die Quaddeln sind mit einem Stift markiert.

b: Reibetest am kontralateralen Unterarm desselben Patienten, starke Quaddelbildung und Hautrötung in den Konzentrationen Nr. 2 (200 ng/µl) und Nr. 3 (100 ng/µl).

c: Vergrößerung des Bereichs von Fig. 8a bevor die Quaddeln angezeichnet wurden. Die urtikarielle Reaktion mit der Bildung von Pseudopodien (Nr. 6) ist gut zu erkennen.

d: Vergrößerung von Fig. 8b: Quaddelbildung im Reibetest bei der Konzentration Nr. 2 nach 20 min. 45

[0041] Fig. 9: Spätdphasenreaktionen nach 24 h bei der Hauttestung mit dem rekombinanten p40 Allergen mit Hexahistidintag.

a: Reibetest: ekzematöse Reaktion in den Konzentrationen Nr. 6 (12,5 ng/µl) bis Nr. 2 (200 ng/µl). Nr. 1 wurde nicht durchgeführt.

b: Reibetest: keine ekzematöse Reaktionen in den Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 7.

c: Vergrößerung von Fig. 9a: Ekzematöse Reaktion bei Konzentration Nr. 4.

d: Pricktest: Infiltrierte Papeln innerhalb der markierten Grenzen der vorangegangenen Soforttyp-Reaktion. 50

[0042] Fig. 10: Immunoblot-Inhibitionsexperiment. Drei mit rekombinantem p40 Allergen aus der Dörrobstmotte positive Seren wurden verwendet, um mit und ohne Präinkubation mit rekombinantem p40 allergenhaltige Extrakte aus verschiedenen Spezies (Dörrobstmotte, Küchenschabe, Hausstaubmilbe, Hummer, Garnelen, Miesmuschel und Kabeljau) zu testen. Die Molkulargewichte sind auf der linken Seite der Immunoblots angegeben, von oben nach unten 66, 46, 30 und 21 kDa.

SEQ ID No. 1 zeigt die cDNA des Allergens p40 aus *Plodia interpunctella*, 55
SEQ ID No. 2 zeigt die davon abgeleitete Proteinsequenz,

SEQ ID No. 3 zeigt die cDNA des Allergens p33 aus *Plodia interpunctella*,

SEQ ID No. 4 zeigt die davon abgeleitete Proteinsequenz,

SEQ ID No. 5 zeigt die cDNA des Allergens p84 aus *Plodia interpunctella*,

SEQ ID No. 6 zeigt die davon abgeleitete Proteinsequenz,

SEQ ID No. 7 zeigt die cDNA des Allergens p27 aus *Plodia interpunctella*, und

SEQ ID No. 8 zeigt die davon abgeleitete Proteinsequenz. 60

Beispiele

Beispiel 1

5 Test von verschiedenen Gruppen von Allergikern und Normalpersonen auf IgE-Antikörper gegen Mottenantigene aus Larven der Dörrobstmotte *P. interpunctella*

[0043] Da im klinischen Bereich eine mögliche Allergie gegen Motten bislang kaum Beachtung gefunden hat, konnte bei der Auswahl der Patienten keine Gruppe definiert werden, die klinische Beschwerden nach Kontakt mit Mottenallergenen als Symptom angab. Deshalb stellten wir für unsere Arbeit die folgenden Gruppen zusammen, die auf IgE-Antikörper gegen Mottenproteine getestet wurden:

1. Patienten mit Typ I allergischen Beschwerden (Rhinitis, Conjunctivitis, allergisches Asthma bronchiale) in Innenräumen (n = 90, Patienten H1–H90),
- 15 2. Patienten mit atopischer Dermatitis und Typ I allergischen Beschwerden (Rhinitis, Conjunctivitis, allergisches Asthma bronchiale) in Innenräumen (n = 12, Patienten AH1–AH12),
3. Patienten mit nachgewiesener Pollenallergie ohne Typ I allergische Beschwerden (Rhinitis, Conjunctivitis, allergisches Asthma bronchiale) in Innenräumen (n = 20, Patienten P1–P20),
- 20 4. Probanden ohne atopische Dermatitis und ohne nachgewiesene Typ I Allergien (n = 10, Probanden N1–N10).

IgE-Reaktivität von natürlichen Mottenextrakten

[0044] Präparationen von zwei verschiedenen Mottenspezies wurden verwendet, um mottenspezifische IgE-Antikörper in Patientenserien zu detektieren. Die eine Präparation ist ein kommerziell erhältliches Homogenisat von Faltern der Mehlmotte *Ephesia kuehniella* (Allergon, Pharmacia Upjohn, Uppsala, Schweden). Die andere Präparation wurde aus Mottenlarven (Wanderstadium, kurz vor der Verpuppung) von der Dörrobstmotte *Plodia interpunctella* hergestellt. Die Insektenproben (5 Larven) wurden in 0,2 ml PBS homogenisiert, im Verhältnis von 1 : 1 mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt und auf einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Fling und Gregerson, 1986). Es wurde ein präparatives Gel verwendet, auf das etwa 20 µg Gesamtprotein pro cm aufgetragen wurden. Als Marker diente ein Rainbow-Marker (Amersham Pharmacia). Das Gel wurde nach der Elektrophorese auf Nitrozellulose (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) geblottet (Towbin et al., 1979) und in 0,5 cm Streifen geschnitten.

[0045] Der Test der Patientenserien auf IgE gegen Motten wurde analog zu der von Jarolim et al. (1989) beschrieben Methode durchgeführt. Die Streifen wurden 2 × 5 min und 1 × 30 min in Puffer G (42 mM Na₂HPO₄, 6,4 mM NaH₂PO₄, 0,5% (v/v) Tween 20, 0,5% (w/v) Rinderserumalbumin, 0,05% (w/v) NaN₃, pH 7,5) bei Raumtemperatur abgesättigt, dann in 1 ml Volumen in 1 : 10 (wenn nicht anders beschrieben) mit Puffer G verdünnten Patientenserien über Nacht bei 4°C gekippt. Die Streifen wurden 2 × 5 min und 1 × 30 min bei Raumtemperatur in Puffer G gewaschen, dann über Nacht mit einer 1 : 10 Verdünnung eines ¹²⁵I-markierten Anti-Human-IgE Antikörpers (Amersham Pharmacia) bei Raumtemperatur gekippt, wie oben gewaschen, getrocknet und aufgeklebt. Gebundenes mottenspezifisches IgE wurde so mit dem radioaktiv markierten Anti-IgE-Antikörper detektiert und die positiven Signale wurden mittels Autoradiographie auf einem Röntgenfilm (Kodak) sichtbar gemacht.

[0046] Die Fig. 1 zeigt in ihrem oberen Teil die Resultate dieses Experiments für die Gruppe der "Indoor"-Allergiker (Patienten mit allergischen Beschwerden in Innenräumen), Figur. 2 zeigt im oberen Teil die Ergebnisse für die anderen drei Gruppen. Die Ergebnisse sind auch weiter unten in Tabelle 1 dargestellt.

45 Tabelle 1

[0047] Zusammenfassung der IgE-Immunoblotresultate gegen verschiedene Allergenextrakte und gegen das rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag aus der Dörrobstmotte, + + +, sehr starke Reaktion; + + starke Reaktion mit mindestens zwei starken positiven Bändern; + schwache positive Reaktion mit mindestens einer sichtbaren Bande; – keine definierte positive Bande beobachtet.

55

60

65

DE 100 41 541 A 1

Patient	Dörrobst- motten- larven	Mehl- motten- falter	Rek. p40 Allergen (His ₆)	Haus- staub- milbe	Küchen- schabe	
H1	+	+				5
H2	-	-				
H3	-	-				
H4	-	-				
H5	++	+		++	+	10
H6	-	-				
H7	++	++		-		
H8	-	-				
H9	+	+		-		
H10	-	-				15
H11	-	-				
H12	-	-				
H13	++	++		-	++	
H14	-	-				20
H15	-	-				
H16	-	-		+		
H17	+	-		+	-	
H18	-	-				
H19	-	-				25
H20	+++	+++	+++	++	+++	
H21	+	+	-	++	-	
H22	+	+	-	+	-	
H23	-	-				30
H24	-	-				
H25	-	-				
H26	-	-				
H27	-	-				
H28	++	++	-	++	++	35
H29	-	+	-	+	-	
H30	-	-		-		
H31	-	+	-	-	-	
H32	++	++	+++	-	+	40
H33	+	+	-	-	-	
H34	-	-				
H35	+	+	-	-	+	
H36	-	-				45
H37	-	-				
H38	+	-				
H39	++	+	++	+	-	
H40	+	+	-	-	+	50
H41	+	-	-			
H42	+	-	-	-	-	
H43	-	-				
H44	-	-				
H45	+	-	-	+++	-	55
H46	+	+	-	+	-	
						60
						65

DE 100 41 541 A 1

Patient	Dörrobst- motten- larven	Mehl- motten- falter	Rek. p40 Allergen (His ₆)	Haus- staub- milbe	Küchen- schabe
5 H47	-	-	-	-	-
10 H48	+	-	-	-	-
15 H49	-	+	-	-	-
20 H50	-	-	-	-	-
25 H51	-	-	-	-	-
30 H52	-	-	-	-	-
35 H53	++	++	-	+	++
40 H54	+	-	-	-	-
45 H55	-	+	-	-	-
50 H56	-	-	+	-	-
55 H57	++	+	-	-	-
60 H58	++	-	+	++	-
65 H59	-	-	-	-	-
70 H60	-	-	-	-	-
75 H61	+	-	-	-	-
80 H62	+	-	-	-	-
85 H63	+	-	-	-	-
90 H64	+	-	-	-	-
95 H65	-	-	-	-	-
100 H66	-	+	-	-	-
105 H67	-	-	-	-	-
110 H68	-	-	-	-	-
115 H69	+	+	-	-	-
120 H70	++	++	-	-	++
125 H71	-	-	-	-	-
130 H72	+	-	+	+	-
135 H73	++	+	-	-	-
140 H74	-	+	-	-	-
145 H75	-	-	-	-	-
150 H76	+++	++	-	-	++
155 H77	-	-	-	-	-
160 H78	++	++	+	-	+
165 H79	+	++	-	-	++
170 H80	+	+	-	-	-
175 H81	+++	+++	+	-	+++
180 H82	+	++	-	-	+
185 H83	-	-	-	-	-
190 H84	+	-	-	+	-
195 H85	-	-	-	-	-
200 H86	++	+	+	-	+
205 H87	-	-	-	+	-
210 H88	-	-	-	-	-
215 H89	+++	+	+++	+	+
220 H90	-	-	-	+++	-

DE 100 41 541 A 1

Patient	Dörrobst- motten- larven	Mehl- motten- falter	Rek. p40 Allergen (His _e)	Haus- staub- milbe	Küchen- schabe	
AH1	-	-	-	-	-	5
AH2	+	-	-	+	-	
AH3	+	-	-	-	-	
AH4	+	-	-	-	-	10
AH5	+	+	-	-	-	
AH6	+	-	-	-	-	
AH7	-	-	-	-	-	
AH8	++	++	+	+++	++	15
AH9	+	+	-	-	-	
AH10	+++	+++	+	+++	++	
AH11	+++	+++	+++	+++	+++	
AH12	++	+++	-	+++	+	20
P1	+	-	-	-	-	
P2	-	-	-	-	-	
P3	-	-	-	-	-	
P4	+++	+++	+++	+	+++	25
P5	+	+	-	++	+	
P6	-	-	-	-	-	
P7	+	-	-	-	+	
P8	-	-	-	-	-	30
P9	+++	+++	-	+	++	
P10	-	-	-	-	-	
P11	-	-	-	-	-	35
P12	+	-	-	-	+	
P13	-	-	-	-	-	
P14	-	-	-	-	-	
P15	+	-	-	-	-	40
P16	+	-	-	-	-	
P17	-	-	-	-	-	
P18	-	-	-	-	-	
P19	+	++	-	+	+	45
P20	+	++	-	+	+	
N1	-	-	-	-	-	
N2	-	-	-	-	-	
N3	-	-	-	-	-	50
N4	-	-	-	-	-	
N5	-	-	-	-	-	
N6	-	-	-	-	-	
N7	-	-	-	-	-	55
N8	-	-	-	-	-	
N9	-	-	-	-	-	
N10	-	-	-	-	-	60

[0048] Insgesamt wurden bei den "Indoor"-Allergikern (n = 90) beim IgE-Immunoblot mit dem Dörrobstmottenlarven-Gesamtextrakt 4 sehr stark positive, 13 stark positive und 25 schwach positive Reaktionen beobachtet, bei den Atopikern mit allergischen Beschwerden in Innenräumen (n = 12) 2 sehr stark positive, 2 stark positive und 6 schwach positive. Bei den Pollenallergikern ohne angegebene allergische Beschwerden in Innenräumen (n = 20) gab es 2 sehr stark positive und 8 schwach positive Reaktionen. Insgesamt wurde bei 51% der Patienten eine positive Reaktion auf Mottenlarvenproteine beobachtet. Keine der nichtallergischen Kontrollpersonen zeigte eine Reaktion im Immunoblot.

DE 100 41 541 A 1

Test auf IgE-Antikörper gegen Proteine der Mehlmotte (*E. kuehniella*) im Falterstadium

5 [0049] Das gleiche Patientenkollektiv wie oben wurde auf Streifchen mit einem kommerziell erhältlichen Extrakt aus der Mehlmotte untersucht, wobei die Ergebnisse auch in der Tabelle 1 dargestellt sind. Insgesamt zeigten 36% der Allergiker eine positive Reaktion auf Mottenfalter.

Test auf IgE-Antikörper gegen Proteine der Haustaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*) und der Küchenschabe (*Blattella germanica*)

10 [0050] Ausgewählte Patienten und Normalpersonen aus dem Kollektiv wurden auf Streifchen mit kommerziell erhältlichen Extrakten aus der Haustaubmilbe und der Küchenschabe getestet. Die Ergebnisse sind wieder in Tabelle 1 dargestellt. Die Küchenschabe ist ein flügelloses Insekt und näher mit der Dörrrobstmotte verwandt als die Haustaubmilbe, die zu den Spinnentieren zählt. Alle drei zählen zu den Gliederfüßern (Arthropoden). Trotz der phylogenetischen Verwandtschaft der drei Spezies ist die IgE-Reaktivität der Patienten oft stark unterschiedlich. So reagiert zum Beispiel Patient 15 H81 sehr stark auf Motte und Küchenschabe, aber nicht auf die Haustaubmilbe. Patient H90 reagiert nur sehr stark mit der Milbe, aber nicht mit Schabe oder Motte. Patienten H7, H9, H33, H80, AH5 und AH9 reagieren auf Mottenlarven und Falter, aber nicht auf Schabe oder Milbe.

Beispiel 2

20 Isolierung und molekulare Charakterisierung eines cDNA Klons, der für das *P. interpunctella* Allergen p40 kodiert

Konstruktion einer cDNA-Bank von *Plodia interpunctella*

25 [0051] Die Insekten (*Plodia interpunctella*) wurden in Haferflocken angezüchtet (S. Prozell, M. Schöller, Institut für Vorratschutz, Biologische Bundesanstalt, Berlin). 180 Larven im späten Wanderstadium, kurz vor der Verpuppung (2,4 g) wurden zur Präparation von RNA eingesetzt. Die Larven wurden in 30 ml Trizol Reagens (Life Technologies, Frederick, MD, USA) homogenisiert, und aus der wäßrigen Phase wurde nach dem Protokoll des Herstellers die RNA gewonnen. Aus 5 µg der erhaltenen Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des PolyATtract Systems (Promega, Madison, WI, USA) polyA⁺ RNA gewonnen. Die mRNA wurde in cDNA überschrieben und diese mit Hilfe des Uni-ZAP Systems (Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf gerichtete Weise in λ ZAP Phagen eingebaut. Die primäre Bank enthielt 3×10^6 cDNA Klone und wurde nach Standardmethoden amplifiziert.

IgE-Immunoscreening und Analyse der immunopositiven Klone

35 [0052] Zum Screening einer cDNA-Bank von *Plodia interpunctella* wurden Seren der Patienten AH11 (Screen 1), H20 (Screen 2) und AH10 und AH12 (Screen 3) verwendet. 360000 (Screen 1) oder 200000 (Screen 2, 3) Phagen der λ ZAP cDNA Bank wurden auf einem Rasen von *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) Zellen in einer Dichte von 15000 Phagen pro Petrischale mit 140 mm Durchmesser ausplattiert. Die Synthese von rekombinanten Proteinen wurde durch Auflegen von Nitrozellulosefiltern (Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) induziert, die mit einer 10 mM IPTG (Isopropylthio-β-D-Galaktosid) Lösung getränkt waren (Huynh et al., 1985). 31 (Screen 1, Patient AH11) bzw. 11 (Screen 2, Patient H20) und 6 (Screen 3, Patienten AH10 und AH12) immunpositive Klone wurden jeweils mit Hilfe von Patientenserien und von ¹²⁵I-markierten, gegen humanes IgE gerichteten Antikörpern (Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Schweden) nach etablierten Methoden (Breiteneder et al., 1989; Valenta et al., 1991; Vrtala et al., 1993) isoliert.

45 DNA-Sequenzanalyse der immunopositiven Klone

50 [0053] Aus den positiven Phagen wurden durch "in vivo excision" (Shori et al., 1988) mit Hilfe von Helperphagen (Stratagene, La Jolla, CA) die entsprechenden cDNA Plasmide gewonnen und nach Standardmethoden isoliert. Die DNA wurde mit Hilfe von Thermosequenase (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) und IRD800-markierten Primern (MWG Biotech, Ebersberg) auf einem LI-COR Sequenzer (LI-COR, Lincoln, NE) analysiert. Die Basensequenzen wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit Hilfe des FastA-Programms (Pearson und Lipman, 1988) mit der SwissProt Datenbank verglichen. Alle Klone wurden mit Hilfe des GAP Programms aus dem UWGCG Programmepaket (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) miteinander verglichen. Auf diese Weise und mit Hilfe des Vergleichs zu den homologen Proteinen wurden Klone identifiziert, die einen kompletten Leserahmen aufwiesen.

55 [0054] Beim Screening von 360000 Phagen der λ ZAP cDNA Bank mit dem Serum AH11 wurden 31 immunpositive Klone erhalten. Die in vivo exzidierten Plasmide wurden zunächst mit EcoRI und XbaI gespalten und auf einem Agarosegel wurden die Schnittmuster analysiert. Alle analysierbaren Klone enthielten dieselbe cDNA. Der längste verfügbare 60 Klon wurde sequenziert (Fig. 3) und der offene Leserahmen, der ein Polypeptid von vorhergesagten 40 kDa (p40) darstellte, wurde mit den Datenbanken verglichen. Es zeigte sich, daß das gefundene Polypeptid (Fig. 3) über die gesamte Länge mit Arginin-kinasen verschiedener Spezies homolog war. Arginin-kinasen können die terminale Phosphatgruppe von ATP auf Arginin übertragen und so einen Energiereservestoff bilden. Bislang sind Arginin-kinasen nicht als Allergene identifiziert worden (siehe auch Einleitung). Die dem p40 Allergen am nächsten verwandte Arginin-kinase aus der Honigbiene (Kucharski und Maleszka, 1998) weist 85% Aminosäure-Sequenzidentität mit p40 auf.

DE 100 41 541 A 1

Beispiel 3

Isolierung und molekulare Charakterisierung eines cDNA Klons, der für das *P. interpunctella* Allergen p33 kodiert

[0055] 200000 Phagen der λ ZAP cDNA Bank wurden wie oben beschrieben mit dem Serum H20 gescreent, dabei wurden 11 immunopositive Klone erhalten. Die in vivo exzidierten Plasmide wurden wie oben analysiert und sequenziert. 10 der 11 Klone kodierten für das gleiche Protein. Drei der Klone hatten die volle Länge, und zwei von ihnen hatten die identische Sequenz, die in Fig. 4 dargestellt ist. Der offene Leserahmen stellt ein Allergen von 33 kDa dar (p33), das mit Tropomyosinen verschiedener Spezies eng verwandt ist. Tropomyosine sind als kreuzreagierende Allergene besonders auch aus dem Bereich der Nahrungsmittelallergie bekannt (Reese et al., 1999). 5
10

Beispiel 4

Isolierung und molekulare Charakterisierung eines cDNA Klons, der für das *P. interpunctella* Allergen p84 kodiert

[0056] 200000 Phagen der λ ZAP cDNA Bank wurden wie oben beschrieben mit den Seren AH10 und AH12 gescreent, dabei wurden 6 immunopositive Klone erhalten. Die in vivo exzidierten Plasmide wurden wie oben analysiert und sequenziert. Nur einer der Klone (Sequenz Fig. 5) kodierte für ein Protein in voller Länge, es handelte sich um ein homologes zu Arylphorinen. Arylphorine gelten als Speicherproteine von Insekten und enthalten einen hohen Anteil an Tyrosin. Ein Arylphorin der Schabe (*Periplaneta americana*) ist bereits in einer Publikation (Wu et al., 1996) als Allergen beschrieben. 15
20

Beispiel 5

Isolierung und molekulare Charakterisierung eines cDNA Klons, der für das *P. interpunctella* Allergen p27 kodiert

[0057] 200000 Phagen der λ ZAP cDNA Bank wurden wie oben beschrieben mit dem Serum H20 gescreent (Screen 2), ebenso wie mit den Seren AH 10 und AH12 (Screen 3). Die in vivo exzidierten Plasmide wurden wie oben analysiert und sequenziert. Einer der Klone von Screen 2 und drei der Klone von Screen 3 kodierten für das gleiche Protein. Ein Sequenzvergleich der durch Übersetzung erhaltenen Aminosäuresequenz ergab eine signifikante Ähnlichkeit mit einer Glukose 1-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium* (36 % Sequenzidentität, Nagao et al., 1992). Es gab auch eine kleinere aber noch signifikante Ähnlichkeit mit dem Alt a 2 Allergen aus dem Pilz *Alternaria alternata* (26% Sequenzidentität, De Vouge et al., 1998), einer Aldehyddehydrogenase, und dem Bet v 5 Allergen aus der Birke (20% Sequenzidentität, Karamloo et al., 1999), einer Isoflavonreduktase. Bei dem p27 Allergen handelt es sich also um ein Redoxenzym. Die Sequenz ist in Fig. 6 dargestellt. 25
30
35

Beispiel 6

Expression des p40 Allergens mit einem Hexahistidintag und als Fusionsprotein in *E. coli*

[0058] Die p40 cDNA wurde auf zwei verschiedene Weisen in pET-Expressionsvektoren einkloniert so daß das p40 Allergen einmal nur mit einem Hexahistidintag und einmal als Fusionsprotein mit einer Zellulosebindenden Domäne erzeugt wurde. Das erste Konstrukt wurde unter nativen Bedingungen gereinigt. Das zweite Konstrukt wurde über eine Zellulosesäule gereinigt. Sowohl das Fusionsprotein mit einer zellulosebindenden Domäne als auch das Nichtfusionsprotein mit Hexahistidintag besaßen Arginin kinaseaktivität. 40
45

Konstruktion eines Expressionsvektors zur Expression des p40 Allergens mit einem Hexahistidin- "Tag"

[0059] Die komplette cDNA wurde in zwei Stufen in die EcoRI und XbaI Schnittstellen des Plasmids pET23(+) (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) einkloniert. Die Ribosomenbindungsstelle wurde mit Hilfe der Oligonukleotidabhängigen Mutagenese nach Kunkel et al., (1987) in den Expressionsvektor eingebaut. Dazu wurde das Mutagenesecoligonukleotid 5'-GGT AGC GGC GTC CAC CAT GGT ATA TCT CCT TCT AGA GGG AAA CCG-3' verwendet. Der entstandene Vektor pETAK1 wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft. In dem Vektor wurde dann am carboxyterminalen Ende der Sequenz durch eine zweite Mutagenese mit dem Oligonukleotid 5'-ATC TCA GTG GTG GTG GTG GTG CAG GGA TTT CTC GAT TTT GAT-3' ein Hexahistidintag für die Reinigung über eine Nickelaffinitätsäule (Qiagen, Hilden, Deutschland) in das Expressionsplasmid eingebracht, und es entstand der Vektor pETHisAK1, der durch Sequenzierung überprüft wurde. 50
55

Expression und Reinigung des p40 Allergens als Nichtfusionsprotein mit einem Hexahistidin- "Tag"

[0060] Der Vektor pETHisAK1 wurde in *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformiert und die transformierten Zellen in einer 400 ml Kultur bei 37°C geschüttelt bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,8. Die Synthese des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 0,4 mM (Endkonzentration) von IPTG (Isopropyl- β -D-Galaktosid) induziert, und die Kultur wurde noch 3 h bei 37°C weitergeschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, dann wurden die Zellen 10 min in Lysepuffer (100 mM KCl, 50 mM Mes, 4% (v/v) Triton X-100, 8 mM DTT, 8 mM EDTA, 25 μ g/ml Polymyxin B Sulfat (Sigma, St Louis, MO, USA), pH 7,5) behandelt (Schupp et al., 1995). Zelldebris wurde 30 min bei 2000 \times g und 4°C abzentrifugiert. Das Protein wurde mit Hilfe von zentrifugierbaren Kleinsäulen unter nativen Bedingungen durch Nickelchelat-Affinitätschromatographie gereinigt wie vom Hersteller (Qiagen) beschrieben. 60
65

DE 100 41 541 A 1

Konstruktion eines Expressionsklons zur Expression des p40 Allergens als Fusionsprotein

[0061] Die komplette cDNA, die für das p40 Allergen kodiert, wurde in den Expressionsvektor pET36b (Novagen) nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) unter Verwendung der EcoRI und XbaI Restriktionsstellen umkloniert. Dies geschah in zwei Stufen, da die cDNA eine interne XbaI-Stelle aufwies. Der noch fehlende Übergang zwischen der Sequenz, die für die Zellulose bindende Domäne kodierte und der Sequenz, die für die Arginin kinase kodierte, wurde mit Hilfe der Oligonukleotid-abhängigen Mutagenese nach Kunkel et al., (1987) in den Expressionsvektor eingebaut.

[0062] Dazu wurde das Mutageneseoligonukleotid 5'-GGT AGC GGC GTC CAC CAT GGT ATA TCT CCT TCT AGA GGG AAA CCG-3' verwendet. Der entstandene Vektor pCBDAK1 wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft.

10

Expression eines Fusionsproteins aus einer Zellulose-bindenden Domäne und dem p40 Allergen

[0063] Der Vektor pCBDAK1 wurde in Escherichia coli BL21 (DE3) transformiert und die transformierten Zellen in einer 400 ml Kultur bei 37°C geschüttelt bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,8. Die Synthese des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 0,4 mM (Endkonzentration) von IPTG (Isopropyl- β -D-Galaktosid) induziert, und die Kultur wurde noch 3 h bei 37°C weitergeschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, dann wurden die Zellen 10 min in Lysepuffer (100 mM KCl, 50 mM Mes, 4% (v/v) Triton X-100, 8 mM DTT, 8 mM EDTA, 25 μ g/ml Polymyxin B Sulfat (Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 7,5) behandelt (Schupp et al., 1995). Zelldestritus wurde 30 min bei 2000 \times g und 4°C abzentrifugiert. Das Fusionsprotein wurde durch Zellulose-Affinitätschromatographie gereinigt wie vom Hersteller (Novagen) beschrieben.

15

[0064] Der Vektor pCBDAK1 wurde in Escherichia coli BL21 (DE3) transformiert und die transformierten Zellen in einer 400 ml Kultur bei 37°C geschüttelt bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,8. Die Synthese des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 0,4 mM (Endkonzentration) von IPTG (Isopropyl- β -D-Galaktosid) induziert, und die Kultur wurde noch 3 h bei 37°C weitergeschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, dann wurden die Zellen 10 min in Lysepuffer (100 mM KCl, 50 mM Mes, 4% (v/v) Triton X-100, 8 mM DTT, 8 mM EDTA, 25 μ g/ml Polymyxin B Sulfat (Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 7,5) behandelt (Schupp et al., 1995). Zelldestritus wurde 30 min bei 2000 \times g und 4°C abzentrifugiert. Das Fusionsprotein wurde durch Zellulose-Affinitätschromatographie gereinigt wie vom Hersteller (Novagen) beschrieben.

20

Test des rekombinanten p40 Allergens mit Hexahistidintag und des Fusionsproteins aus einer Zellulose-bindenden Domäne und dem p40 Allergen auf IgE-Reaktivität

[0065] Das gereinigte p40 Allergen mit einem Hexahistidintag wurde wie oben beschrieben in einer Konzentration von 10 μ g pro cm auf einem präparativen 12,5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisiert, auf Nitrozellulose geblottet und mit jenen Patientenserien getestet, die in den oben beschriebenen Experimenten mit dem Extrakt von P. interpunctella Larven getestet worden waren.

[0066] Das gereinigte rekombinante Fusionsprotein wurde wie oben beschrieben in einer Konzentration von 5 μ g pro cm auf einem präparativen 12,5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisiert, auf Nitrozellulose geblottet und mit jenen Patientenserien getestet, die in den oben beschriebenen Experimenten mit dem Extrakt von P. interpunctella Larven positive Signale ergeben hatten.

25

Test der oben beschriebenen Patienten und Normalpersonen auf IgE-Antikörper gegen das rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag

30

[0067] Alle Seren der oben beschriebenen Patienten und Normalpersonen wurden auf gleiche Weise wie oben beschrieben auf IgE-Antikörper gegen das gereinigte p40 Allergen mit Hexahistidintag getestet (Fig. 1, 2, Tabelle 1). Bei diesem Versuch zeigte sich eine Reaktivität nur im Molekulargewichtsbereich bei 40 kDa, deshalb ist ein schmälerer Ausschnitt der Immunoblots unter den Blots mit Larvenproteinen dargestellt. Insgesamt waren 10 von 90 "Indoor"-Allergikern positiv, 3 von 12 Atopikern mit "Indoor"-Allergie und einer von 20 Pollenallergikern ohne angegebene allergischen Beschwerden in Innenräumen. Das bedeutet, dass 11% der Patienten H1–H90 und 23% der Patienten AH1–AH12 IgE gegen Larven der Dörrobstmotte hatten.

35

Test von Patienten und Normalpersonen auf IgE-Antikörper gegen das rekombinante p40 Fusionsprotein mit Zellulose-bindender Domäne

40

[0068] Das gereinigte rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag wurde in steriler 0,9% NaCl-Lösung auf 10 verschiedene Konzentrationen eingestellt: Nr. 1 enthielt 400 ng/ μ l, die weiteren Proben enthielten absteigende Konzentrationen von 200 ng/ μ l (Nr. 2), 100 ng/ μ l (Nr. 3), 50 ng/ μ l (Nr. 4), 25 ng/ μ l (Nr. 5), 12,5 ng/ μ l (Nr. 6), 6,25 ng/ μ l (Nr. 7), 3,13 ng/ μ l (Nr. 8), 1,56 ng/ μ l (Nr. 9) und 0,78 ng/ μ l (Nr. 10). Vor dem intrakutanen Hauttest wurde am kontralateralen Arm ein Reibetest mit je 30 μ l der Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 2 durchgeführt und nach 5, 10 und 20 min sowie 24 h abgelesen. Die Negativkontrolle war 0,9% NaCl, als Positivkontrolle wurde Histaminhydrochlorid in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Basierend auf den Ergebnissen des Reibetests wurde dann der Pricktest in den Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 5 durchgeführt und jeweils nach 20 min und 24 h abgelesen.

45

[0069] Der motteallergische Patient AH11 wurde gegen das rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag zuerst

50

im Reibetest und dann im Pricktest untersucht. Im Reibetest (Fig. 8b) riefen die Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 6 keine Sofortreaktionen hervor, die Konzentration Nr. 5 induzierte einen leichten Juckreiz im Probegebiet. Nr. 4 rief nach 5–10 Minuten winzige Quaddeln hervor. Nr. 3 und Nr. 2 riefen multiple Quaddeln (Durchmesser 4–5 mm) hervor. Diese hatten nach 15–20 min die maximale Ausprägung (Fig. 8d) und bildeten sich alle nach 45 min zurück.

Beispiel 7

Hauttests

55

[0070] Das gereinigte rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag wurde in steriler 0,9% NaCl-Lösung auf 10 verschiedene Konzentrationen eingestellt: Nr. 1 enthielt 400 ng/ μ l, die weiteren Proben enthielten absteigende Konzentrationen von 200 ng/ μ l (Nr. 2), 100 ng/ μ l (Nr. 3), 50 ng/ μ l (Nr. 4), 25 ng/ μ l (Nr. 5), 12,5 ng/ μ l (Nr. 6), 6,25 ng/ μ l (Nr. 7), 3,13 ng/ μ l (Nr. 8), 1,56 ng/ μ l (Nr. 9) und 0,78 ng/ μ l (Nr. 10). Vor dem intrakutanen Hauttest wurde am kontralateralen Arm ein Reibetest mit je 30 μ l der Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 2 durchgeführt und nach 5, 10 und 20 min sowie 24 h abgelesen. Die Negativkontrolle war 0,9% NaCl, als Positivkontrolle wurde Histaminhydrochlorid in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Basierend auf den Ergebnissen des Reibetests wurde dann der Pricktest in den Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 5 durchgeführt und jeweils nach 20 min und 24 h abgelesen.

[0071] Der motteallergische Patient AH11 wurde gegen das rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag zuerst im Reibetest und dann im Pricktest untersucht. Im Reibetest (Fig. 8b) riefen die Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 6 keine Sofortreaktionen hervor, die Konzentration Nr. 5 induzierte einen leichten Juckreiz im Probegebiet. Nr. 4 rief nach 5–10 Minuten winzige Quaddeln hervor. Nr. 3 und Nr. 2 riefen multiple Quaddeln (Durchmesser 4–5 mm) hervor. Diese hatten nach 15–20 min die maximale Ausprägung (Fig. 8d) und bildeten sich alle nach 45 min zurück.

[0070] Nach dem Reibetest wurde der Pricktest mit den gleichen Verdünnungen (Nr. 10 bis Nr. 5) in aufsteigenden Konzentrationen durchgeführt (Fig. 8a). Auf die Konzentrationen Nr. 10 und Nr. 9 wurde keine unmittelbare Hautreaktion beobachtet. Quaddeln und Hautrötung traten in den Konzentrationen Nr. 8 (3,12 ng/µl) bis Nr. 5 (25 ng/µl) auf. Der Durchmesser der Quaddeln war zwischen 7 mm (Konzentration Nr. 8) und 15 mm (Konzentration Nr. 6) (Fig. 8c). Aufgrund der Stärke der Reaktionen von den Konzentrationen Nr. 8 bis Nr. 5 wurden Konzentrationen Nr. 4 bis Nr. 1 nicht getestet. Die Quaddeln wurden zur Dokumentation bei ihrer maximalen Ausprägung nach 20 min mit einem Stift markiert und bildeten sich nach 45 min spontan zurück. 5

[0071] Bei der Ablesung nach 24 h wurden innerhalb der markierten Grenzen der vorangegangenen Soforttyp-Reaktionen akzematoid Papeln als Spätphasenreaktion des Pricktests beobachtet (Fig. 9d). Der kontralaterale Arm, an dem der Reibetest durchgeführt worden war, zeigte eine ausgeprägte ekzematöse Reaktion im Gebiet der Konzentrationen Nr. 6 bis Nr. 4 (Fig. 9a, c), während bei den niedrigeren Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 7 keine ekzematöse Reaktion beobachtet wurde (Fig. 9b). 10

Beispiel 8

15 Immunoblot-Inhibition und Nachweis der Kreuzreakтивität des p40 Allergens mit Allergenen verschiedener Spezies

[0072] Aus der Literatur ist bekannt, daß eine enzymatische Argininkinaseaktivität praktisch in allen untersuchten Invertebraten vorkommt. Um zu überprüfen, welche immunologische Ähnlichkeiten zwischen dem p40 Allergen der Dörr-
obstmotte und den Homologen in anderen Spezies bestehen, wurde ein Immunoblot-Inhibitionsexperiment durchgeführt. 20 Allergenextrakte aus der Milbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Küchenschabe (*Blattella germanica*), Garnelen (*Penaeus monodon*), Hummer (*Homarus gammarus*), Miesmuschel (*Mytilus edulis*), und Kabeljau (*Gadus morhua*) als einzige Vertebraten wurden entweder eingekauft (Milbe und Schabe) oder aus frisch eingekauftem, ungekochten Muskel-
fleisch präpariert. 25

[0073] Die Gesamtallergene von der Milbe und der Küchenschabe stammten von Pharmacia/Allergon. Die verschiedenen Meeresfrüchte wurden in frischem, ungekochten Zustand auf dem Naschmarkt in Wien erworben. Es wurde so gut wie möglich nur Muskelfleisch verarbeitet. Die verschiedenen Proben (1–5 g) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, in der Reibschale zerrieben, mit 3 ml pro g Probe in eiskaltem bidest. H₂O mit 5 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) 1 h bei 4°C gerührt. Ein Volumen Auftragspuffer (Fling und Gregerson, 1986) wurde zugesetzt und die Proben wurden 10 min bei 95°C denaturiert, unlösliche Bestandteile wurden 10 min bei 14500 Upm und 4°C abzentrifugiert, und die Proteinkonzentration der Extrakte wurde auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel abgeschätzt. Wie oben wurden präparative Gele mit 200 µg Protein pro cm gefahren, auf Nitrozellulose geblottet und in Streifen geschnitten. 30

[0074] Das Serum des Patienten AH11 und von den Patienten H89 und H32 wurde in der Konzentration 1 : 10 mit Puffer G (42 mM Na₂HPO₄, 6,4 mM NaH₂PO₄, 0,5% (v/v) Tween 20, 0,5% (w/v) Rinderserumalbumin, 0,05% (w/v) NaN₃, pH 7,5) verdünnt. Je 1 ml der Proben wurde entweder mit 10 µg des rekombinanten p40 Allergens mit Hexahistidintag in Puffer G, oder nur in Puffer G über Nacht bei 4°C präinkubiert, und dann wurde je mit einem Streifen Nitrozellulose mit geblotteten Extrakten die IgE-Reaktivität bestimmt. Das gebundene IgE wurde wie üblich mit jodmarkierten Antihuman-IgE Antikörpern detektiert. 35

[0075] Bei allen untersuchten Invertebratespezies reagierten die Seren mit einer Bande im Bereich von 40 kDa, die durch Präinkubation mit dem rekombinanten p40 Allergen aus der Dörrobstmotte entweder ausgelöscht (Dörrobstmotte, Hausstaubmilbe) oder abgeschwächt (Küchenschabe, Garnelen, Hummer, Miesmuschel) wurde (Fig. 10). Im Extrakt aus Kabeljau gab es zwar eine Reihe von allgemeinen Proteinen, aber keines von ihnen wurde durch Präinkubation mit dem p40 Allergen aus der Motte teilweise oder vollständig inhibiert. 40

45 LITERATUR

Anisic E O, Moreland B H, Watts D C (1975) Evolutionary variation between a monomer and a dimer arginine kinase. Biochem. J. 145: 535–543.

Arruda L K, Vailes L D, Benjamin D C, Chapman M D (1995) Molecular cloning of German cockroach (*Blattella germanica*) allergens. Int. Arch. Allergy Immunol. 107: 295–297.

Baldo B A, Panzani R C (1988) Detection of IgE antibodies to a wide range of insect species in subjects with suspected inhalant allergies to insects. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 85: 278–287.

Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, Scheiner O, Breitenbach M (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. EMBO J. 8: 1935–1938.

Davis F M, Jenkins J N (1995) Management of scales and other insect debris: occupational health hazard in a lepidopterous rearing facility. J. Econ. Entomol. 88: 185–191.

De Vouge M W, Thaker A J, Zhang L, Muradie G, Rode H, Vijay H M (1998) Molecular cloning of IgE-binding fragments of *Alternaria alternata* allergens. Int. Arch. Allergy Immunol. 116: 261–268.

Fling S P, Gregerson D S (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. Anal. Biochem. 155: 83–8.

Huynh T V et al., In: cDNA cloning, Oxford, IRL Press, 1 (1985) 49–78.

Jarolim E, Rumpold H, Endler A T, Ebner H, Breitenbach M, Scheiner O, Kraft D (1989) IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. Allergy 44: 385–395.

Karamloo F, Schmitz N, Scheuer S, Poetsch K, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S (1999) Molecular cloning and characterization of a birch pollen minor allergen, Bet v 5, belonging to a family of isoflavone reductaserelated proteins. J. Allergy Clin. Immunol. 104: 991–999.

DE 100 41 541 A 1

Komase Y, Sakata M, Azuma T, Tanaka A, Nakagawa T (1997) IgE antibodies against ridge and moth found in Japanese asthmatic subjects and comparison of allergenicity between these insects. *Allergy* 52: 75-81.

Kraft D, Ferreira F, Vrtala S, Breiteneder H, Ebner C, Valenta R, Susani M, Breitenbach M, Scheiner O (1999) The importance of recombinant allergens for diagnosis and therapy of IgE-mediated allergies. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118: 171-176.

5 Kucharski R, Maleszka R (1998) Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gene* 211: 343-349.

Kunkel T A, Roberts J D, Zakour R A (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154: 367-382.

10 Lin R-Y, Shen H-D, Han S-H (1993) Identification and characterization of a 30 kd major allergen from *Parapenaeus fischeri*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92: 837-845.

Miyamoto T, In: *Advances in Allergology and Clinical Immunology*, Eds Godard P et al., The Parthenon Publishing Group-Carmforth, U. K. and New Jersey, USA, (1992) 343-347.

15 Nagao T, Mitamura T, Wang X H, Negoro S, Yomo T, Urabe I, Okada H (1992) Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J. Bacteriol.* 174: 5013-5020.

Pearson W R, Lipman D J (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448.

20 Reese G, Ayuso R, Lehrer S B (1999) Tropomyosin: an invertebrate panallergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119: 247-258.

Rosenstreich D L, Eggleston P, Kattan M, Baker D, Slavin R G, Gergen P, Mitchell H, McNiff Mortimer K, Lynn H, Ownby D, Malveaux F (1997) The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N. Engl. J. Med.* 336: 1356-1363.

25 Schupp J M, Travis SE, Price L B, Shand R F, Keim P (1995) Rapid bacterial permeabilization reagent useful for enzyme assays. *Biotechniques* 19: 18-20.

Segal D M, Taurog J D, Metzger H (1977) Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2993-2997.

Short J M, Fernandez J M, Sorge J A, Huse W D (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16: 7583-7600.

30 Storms W W, Berry C, Withee W (1981) Miller moth asthma. *Clin. Allergy* 11: 55-59.

Suzuki M, Itoh H, Sugiyama K, Takagi I, Nishimura J, Kato K, Mamiya S, Baba S, Ohya Y et al. (1995) Causative allergens of allergic rhinitis in Japan with special reference to silkworm moth allergen. *Allergy* 50: 23-27.

Thomas W R, Smith W (1999) Towards defining the full spectrum of important house dust mite allergens. *Clin. Exp. Allergy* 29: 1583-1587.

35 Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.

Unger A, Stoger P, Simon Nobbe B, Susani M, Cramer R, Ebner C, Hintner H, Breitenbach M (1999) Clinical testing of recombinant allergens of the mold *Alternaria alternata*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118: 220-221.

40 Valenta R, Duchêne M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O (1991) Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253: 557-560.

Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H (1999) The recombinant-allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin. Exp. Allergy* 29 (1999) 896-904.

45 Van Wijnen J H, Verboeff A P, Mulder Folkerts D K, Brachel H J, Schou C (1997) Cockroach allergen in house dust. *Allergy* 52: 460-464.

Vrtala S, Spero W R, Reimitzter I, von Ree R, Laffer S, Muller W D, Valent P, Lechner K, Rumpold H, Kraft D, et al. (1993) cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; characterization of the recombinant Phl pV allergen. *J. Immunol.* 151: 4773-4781.

50 Wang X, Zheng S, Zhang H (1994) A study of occupational asthma and specific IgE in sericulture workers. *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao.* 16: 323-327.

Wu C H, Lee M F, Liao S C, Luo S F (1996) Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. Homology with insect hemolymph proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 17937-17943.

55 Wyss M, Maughan D, Wallimann T (1995) Re-evaluation of the structure and physiological function of guanidino kinases in fruitfly (*Drosophila*), sea urchin (*Psammechinus miliaris*) and man. *Biochem. J.* 309: 255-261.

55

60

65

DE 100 41 541 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Duchene, Michael

<120> Rekombinante Allergene aus der Motte *Plodia interpunctella*

5

<130> 22034pdemd

10

<140>

<141>

<160> 8

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 1294

<212> DNA

<213> *Plodia interpunctella*

25

<220>

<221> CDS

30

<222> (25)..(1089)

<400> 1

tcaagtgtca	gaaaagcagc	agca	atg	gtg	gac	gcc	gct	acc	ctt	gag	aaa	51	35
			Met	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Leu	Glu	Lys		
			1						5				

ttg	gag	gct	ggc	ttc	agc	aag	ctt	gcc	gcc	tcc	gac	tca	aag	tcg	ctg	99	40
Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala	Ser	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu		
10	15	20					25										

ctg	aag	aaa	tac	ctc	acc	agg	gag	gta	ttt	gat	gct	ctc	aag	aac	aag	147	45
Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Phe	Asp	Ala	Leu	Lys	Asn	Lys		
30	35		35		35	40											

aag	acc	tca	ttt	ggt	tca	act	ctc	ctg	gat	tct	atc	cag	tca	ggt	gtt	195	50
Lys	Thr	Ser	Phe	Gly	Ser	Thr	Leu	Leu	Asp	Ser	Ile	Gln	Ser	Gly	Val		
45	50		50		50	55											

gag	aac	tta	cat	tcg	ggt	gtt	gga	att	tat	gcc	cca	gat	gct	gag	gca	243	55
Glu	Asn	Leu	His	Ser	Gly	Val	Gly	Ile	Tyr	Ala	Pro	Asp	Ala	Glu	Ala		
60	65		65		65	70											

tat	gta	gta	ttt	gca	gac	ttg	tgc	gac	ccc	atc	att	gaa	gat	tac	cac	291	60
Tyr	Val	Val	Phe	Ala	Asp	Leu	Phe	Asp	Pro	Ile	Ile	Glu	Asp	Tyr	His		

65

DE 100 41 541 A 1

aat ggc ttc aag aaa acc gac aag cac cct ccc aag aac tgg gga gat	339		
Asn Gly Phe Lys Lys Thr Asp Lys His Pro Pro Lys Asn Trp Gly Asp			
90	95	100	105
5			
gtt gag acc ctc ggg aac ttg gat cct gct ggt gaa ttt gtt gtc tcc	387		
Val Glu Thr Leu Gly Asn Leu Asp Pro Ala Gly Glu Phe Val Val Ser			
10	110	115	120
10			
acc cgt gtc cgc tgc ggt cgc tcc atg gaa ggc tac cca ttc aac ccc	435		
Thr Arg Val Arg Cys Gly Arg Ser Met Glu Gly Tyr Pro Phe Asn Pro			
15	125	130	135
15			
tgc tta aca gag gcc caa tac aag gaa atg gaa gag aaa gtc tcc tcc	483		
Cys Leu Thr Glu Ala Gln Tyr Lys Glu Met Glu Glu Lys Val Ser Ser			
20	140	145	150
20			
aca ctc tcc ggc ctc gag ggt gaa ctg aaa ggc acc ttt ttc cca ctc	531		
25 Thr Leu Ser Gly Leu Glu Gly Glu Leu Lys Gly Thr Phe Phe Pro Leu			
155	160	165	
25			
aca ggc atg tcc aag gag act caa caa cag ttg att gat gac cac ttc	579		
30 Thr Gly Met Ser Lys Glu Thr Gln Gln Leu Ile Asp Asp His Phe			
170	175	180	185
30			
ctg ttc aag gag ggt gat cgc ttc ctc cag gcc gct aac gct tgc cgc	627		
Leu Phe Lys Glu Gly Asp Arg Phe Leu Gln Ala Ala Asn Ala Cys Arg			
35	190	195	200
35			
ttc tgg ccc tcc ggt cgt ggc atc tac cac aat gag aac aag act ttc	675		
Phe Trp Pro Ser Gly Arg Gly Ile Tyr His Asn Glu Asn Lys Thr Phe			
40	205	210	215
40			
ctg gta tgg tgc aat gag gag gac cac ctc cgt ctg atc tcc atg caa	723		
Leu Val Trp Cys Asn Glu Asp His Leu Arg Leu Ile Ser Met Gln			
45	220	225	230
45			
atg ggc ggc gac ctg aag cag gtg tac aag agg ctg gtg agg gga gtg	771		
Met Gly Gly Asp Leu Lys Gln Val Tyr Lys Arg Leu Val Arg Gly Val			
50	235	240	245
50			
aac gac atc gcg aag agg atc cca ttc tcg cac aac gag cgg ctg ggc	819		
Asn Asp Ile Ala Lys Arg Ile Pro Phe Ser His Asn Glu Arg Leu Gly			
55	250	255	260
55			
ttc ctg act ttc tgc ccc acc aac ctg ggc aca acg gtg cgc gca tcg	867		
Phe Leu Thr Phe Cys Pro Thr Asn Leu Gly Thr Thr Val Arg Ala Ser			
60			
65			

DE 100 41 541 A 1

270	275	280		
gtg cac atc aag ctg ccc aag ctg gcg gcc gac aag gcc aag ctg gag			915	
Val	His	Ile		
Lys	Leu	Pro	Lys	
Ala	Ala	Asp	Lys	
Lys	Leu		Glu	
285	290	295		
gag gtg gcc agc aag tac cac ctg cag gtg cgc ggc acc cgc ggc gag			963	
Glu	Val	Ala	Ser	
Lys	Leu	Tyr	His	
Gln	Val	Arg	Gly	
		Thr	Arg	
		Gly	Glu	
300	305	310		
cac acg gag gcc gag ggc ggc gtc tac gac atc tcc aac aag agg cgc			1011	
His	Thr	Glu	Ala	
Glu	Gly	Gly	Val	
Tyr	Asp	Ile	Ser	
Asn	Lys	Arg	Arg	
315	320	325		
atg gga ctc acc gag tac gaa gcc gtc aag gag atg tac gac ggc atc			1059	
Met	Gly	Leu	Thr	
Glu	Tyr	Glu	Ala	
Ala	Val	Lys	Glu	
Met	Tyr	Asp	Ile	
330	335	340	345	
gct gaa ctg atc aaa atc gag aaa tcc ctg taagatgttt aacgatctcg			1109	
Ala	Glu	Leu	Ile	
Lys	Ile	Glu	Lys	
Ser	Leu			
350	355			
cgctatcagt atttttgtta ttatttatcg tttcacata agtattggat gtgaaggggc			1169	
gagggcgaca ctatcgatcg gccttgcgcg gggccgggca cgcggggcgc ccactatact			1229	
gtttcgtaaa agtattgtct ataaggaaat ggaaaaataaa gacagctagc gttaagacaa			1289	
aaaaaa			1294	
<210> 2			45	
<211> 355				
<212> PRT				
<213> <i>Plodia interpunctella</i>				
<400> 2			50	
Met Val Asp Ala Ala Thr Leu Glu Lys Leu Glu Ala Gly Phe Ser Lys				
1	5	10	15	
Leu Ala Ala Ser Asp Ser Lys Ser Leu Leu Lys Lys Tyr Leu Thr Arg				
20	25	30		
Glu Val Phe Asp Ala Leu Lys Asn Lys Lys Thr Ser Phe Gly Ser Thr			60	
35	40	45		
Leu Leu Asp Ser Ile Gln Ser Gly Val Glu Asn Leu His Ser Gly Val			65	
50	55	60		

DE 100 41 541 A 1

Gly Ile Tyr Ala Pro Asp Ala Glu Ala Tyr Val Val Phe Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 5
 Phe Asp Pro Ile Ile Glu Asp Tyr His Asn Gly Phe Lys Lys Thr Asp
 85 90 95
 10 Lys His Pro Pro Lys Asn Trp Gly Asp Val Glu Thr Leu Gly Asn Leu
 100 105 110
 15 Asp Pro Ala Gly Glu Phe Val Val Ser Thr Arg Val Arg Cys Gly Arg
 115 120 125
 20 Ser Met Glu Gly Tyr Pro Phe Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Gln Tyr
 130 135 140
 25 Lys Glu Met Glu Glu Lys Val Ser Ser Thr Leu Ser Gly Leu Glu Gly
 145 150 155 160
 30 Glu Leu Lys Gly Thr Phe Phe Pro Leu Thr Gly Met Ser Lys Glu Thr
 165 170 175
 35 Gln Gln Gln Leu Ile Asp Asp His Phe Leu Phe Lys Glu Gly Asp Arg
 180 185 190
 40 Phe Leu Gln Ala Ala Asn Ala Cys Arg Phe Trp Pro Ser Gly Arg Gly
 195 200 205
 45 Ile Tyr His Asn Glu Asn Lys Thr Phe Leu Val Trp Cys Asn Glu Glu
 210 215 220
 50 Asp His Leu Arg Leu Ile Ser Met Gln Met Gly Gly Asp Leu Lys Gln
 225 230 235 240
 55 Val Tyr Lys Arg Leu Val Arg Gly Val Asn Asp Ile Ala Lys Arg Ile
 245 250 255
 60 Pro Phe Ser His Asn Glu Arg Leu Gly Phe Leu Thr Phe Cys Pro Thr
 260 265 270
 65 Asn Leu Gly Thr Thr Val Arg Ala Ser Val His Ile Lys Leu Pro Lys
 275 280 285
 70 Leu Ala Ala Asp Lys Ala Lys Leu Glu Glu Val Ala Ser Lys Tyr His
 290 295 300
 75 Leu Gln Val Arg Gly Thr Arg Gly Glu His Thr Glu Ala Glu Gly Gly
 305 310 315 320

DE 100 41 541 A 1

Val Tyr Asp Ile Ser Asn Lys Arg Arg Met Gly Leu Thr Glu Tyr Glu
 325 330 335

Ala Val Lys Glu Met Tyr Asp Gly Ile Ala Glu Leu Ile Lys Ile Glu
 340 345 350

Lys Ser Leu
 355

5

10

<210> 3 15
 <211> 1092

<212> DNA
 <213> *Plodia interpunctella* 20

<220>
 <221> CDS
 <222> (31)..(885) 25

<400> 3
 acaggacagt agacacaccaa agccacccacc atg gac gac gct aac aac aac aac 54 30
 Met Asp Ala Ile Lys Lys Lys Met
 1 5

cag gcg atg aag ctg gag aac gac gac gct ttg gac gac gct gct gac atg 102 35
 Gln Ala Met Lys Leu Glu Lys Asp Asn Ala Leu Asp Arg Ala Ala Met
 10 15 20

tgc gag cag cag gcc aag gac gac aac ctc cgt gct gag aag gac gag 150 40
 Cys Glu Gln Gln Ala Lys Asp Ala Asn Leu Arg Ala Glu Lys Ala Glu
 25 30 35 40

gag gag gcc aga caa ttg cag aag aac atc cag acg att gag aac gat 198 45
 Glu Glu Ala Arg Gln Leu Gln Lys Lys Ile Gln Thr Ile Glu Asn Asp
 45 50 55

ctg gac cag acg cag gag gac ctc atg cag gtc aac gac gac gaa 246 50
 Leu Asp Gln Thr Gln Glu Ala Leu Met Gln Val Asn Ala Lys Leu Glu
 60 65 70

gag aaa gag aaa gct ctt cag aac gct gag tcc gaa gtc gct gac ctc 294 55
 Glu Lys Glu Lys Ala Leu Gln Asn Ala Glu Ser Glu Val Ala Ala Leu
 75 80 85

60

aac cga cgt atc caa ctg ctg gaa gag gac ctc gag agg tcc gag gag 342 65
 Asn Arg Arg Ile Gln Leu Leu Glu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Glu Glu

DE 100 41 541 A 1

	90	95	100	
5	cgc ctc gcc acc gcc aca gaa ctg tcc gag gcc agc cag gct gcc			390
	Arg Leu Ala Thr Ala Thr Ala Lys Leu Ser Glu Ala Ser Gln Ala Ala			
105	110	115	120	
10	gat gag tcg gaa cgt gcc cgc aag gtg ctc gag aac agg tca ttg gct			438
	Asp Glu Ser Glu Arg Ala Arg Lys Val Leu Glu Asn Arg Ser Leu Ala			
	125	130	135	
15	gat gaa gag cgt atg gac gct ttg gag aac cag ctg aag gaa gcc agg			486
	Asp Glu Glu Arg Met Asp Ala Leu Glu Asn Gln Leu Lys Glu Ala Arg			
	140	145	150	
20	tcc ctt gct gag gaa gcc gac aag aaa tac gat gag gtt gct cgt aag			534
	Phe Leu Ala Glu Glu Ala Asp Lys Lys Tyr Asp Glu Val Ala Arg Lys			
25	155	160	165	
	ctg gcc atg gtt gag gct gac ctg gag cgc gcg gag gag cgt gcc gaa			582
	Leu Ala Met Val Glu Ala Asp Leu Glu Arg Ala Glu Glu Arg Ala Glu			
30	170	175	180	
	tcc ggc gaa tcc aaa atc gtc gag ctt gag gaa gaa ctg cgc gtg gtt			630
	Ser Gly Glu Ser Lys Ile Val Glu Leu Glu Glu Leu Arg Val Val			
35	185	190	195	200
	ggc aac aac ttg aaa tcc ctg gaa gtc tcc gag gag aag gcc aac caa			678
40	Gly Asn Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Ser Glu Glu Lys Ala Asn Gln			
	205	210	215	
	cgt gag gag gag tac aaa aat cag atc aaa acc ctc acc acc cgc cta			726
45	Arg Glu Glu Glu Tyr Lys Asn Gln Ile Lys Thr Leu Thr Thr Arg Leu			
	220	225	230	
	aag gag gct gag gcc cgc gct gag ttc gcc gag cgt tcc gtg cag aaa			774
50	Lys Glu Ala Glu Ala Arg Ala Glu Phe Ala Glu Arg Ser Val Gln Lys			
	235	240	245	
	ctg caa aag gag gtc gac agg ctt gaa gac gaa ctg gtg gct gag aag			822
55	Leu Gln Lys Glu Val Asp Arg Leu Glu Asp Glu Leu Val Ala Glu Lys			
	250	255	260	
60	gag aaa tac aaa gat att ggt gac gac ctg gac acc ccc ttc gtc gag			870
	Glu Lys Tyr Lys Asp Ile Gly Asp Asp Leu Asp Thr Pro Phe Val Glu			
265	270	275	280	
65	ctc atc ctc aag gaa taaaactcctc acgttgtca cctgggcctg tcccatgcgg			925
	Leu Ile Leu Lys Glu			

DE 100 41 541 A 1

285

ggcagaccca	cgggtcattc	caagacgcgg	ctcttccgcc	agcgattcaa	catctgtaca	985	5									
gatgttataat tcattttata ctcattaaa atattnaat ctatagttt atggcggtat						1045										
ttatttcga gtaatataat aaataattt ttacttattt aaaaaaaaa						1092	10									
<210> 4																
<211> 285							15									
<212> PRT																
<213> <i>Plodia interpunctella</i>																
<400> 4							20									
Met	Asp	Ala	Ile	Lys	Lys	Met	Gln	Ala	Met	Lys	Leu	Glu	Lys	Asp		
1						10								15		
Asn	Ala	Leu	Asp	Arg	Ala	Ala	Met	Cys	Glu	Gln	Gln	Ala	Lys	Asp	Ala	25
20							25							30		
Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Lys	Ala	Glu	Glu	Glu	Ala	Arg	Gln	Leu	Gln	Lys	30
35						40								45		
Lys	Ile	Gln	Thr	Ile	Glu	Asn	Asp	Leu	Asp	Gln	Thr	Gln	Glu	Ala	Leu	35
50						55								60		
Met	Gln	Val	Asn	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Lys	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Asn	40
65						70				75				80		
Ala	Glu	Ser	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Arg	Arg	Ile	Gln	Leu	Glu		45
85							90							95		
Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Ser	Glu	Glu	Arg	Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Lys	50
100						105								110		
Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Asp	Glu	Ser	Glu	Arg	Ala	Arg	Lys	55
115						120								125		
Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ser	Leu	Ala	Asp	Glu	Glu	Arg	Met	Asp	Ala	Leu	60
130						135				140					145	
Glu	Asn	Gln	Leu	Lys	Glu	Ala	Arg	Phe	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Asp	Lys	65
145						150				155				160		
Lys	Tyr	Asp	Glu	Val	Ala	Arg	Lys	Leu	Ala	Met	Val	Glu	Ala	Asp	Leu	70
165						170								175		

DE 100 41 541 A 1

180 185 190

5 195 200 205

10 210 215 220

15 225 230 235 240

20 245 250 255

25 260 265 270

30

35 <210> 5
<211> 2230
<212> DNA
<213> *Plodia interpunctella*

40 <220>
<221> CDS
<222> (13)..(2127)

45 <400> 5
ggtgtgggtgga cg atg aag act gtc ctg atc tta gct ggc ctc gtg gcc ctg 51
Met Lys Thr Val Leu Ile Leu Ala Gly Leu Val Ala Leu
50 1 5 10

55 gcc gcg ggc aac acc ttc ccg gta ttc aga tat gac cac gac gtc gaa act 99
Ala Ala Gly Asn Thr Phe Pro Val Phe Arg Tyr Asp His Val Glu Thr
15 20 25

60 aga aaa ttg gaa gga gac ctt tta cag tac cag tcg aaa ttt ctg tct 147
Arg Lys Leu Glu Gly Asp Leu Leu Gln Tyr Gln Ser Lys Phe Leu Ser
30 35 40 45

65 ctt ctt gag aat gtg aga cag att gac tac gaa gcg gag tac tac aaa 195
Leu Leu Glu Asn Val Arg Gln Ile Asp Tyr Glu Ala Glu Tyr Tyr Lys
50 55 60

DE 100 41 541 A 1

gtt ggc aag ggt tac gac atc gta gcc agc ata gag aac tat tct gac	243	
Val Gly Lys Gly Tyr Asp Ile Val Ala Ser Ile Glu Asn Tyr Ser Asp		
65	70	75
		5
caa gat gca gtc agg gcg ttt gct ggt ctt cga gaa att ggt ttc atg	291	
Gln Asp Ala Val Arg Ala Phe Ala Gly Leu Arg Glu Ile Gly Phe Met		
80	85	90
		10
ccc aaa gct tac aca ttc tcc att ttc tac gac agg cag aga gaa gaa	339	
Pro Lys Ala Tyr Thr Phe Ser Ile Phe Tyr Asp Arg Gln Arg Glu Glu		
95	100	105
		15
gct aag att att tat gac ttg ttc tac agc gct aaa gat ttg gac act	387	
Ala Lys Ile Ile Tyr Asp Leu Phe Tyr Ser Ala Lys Asp Leu Asp Thr		
110	115	120
		20
125		
ttc tac aag act gta gcc tac ggc cga atc tat ttc aac gag tat cag	435	
Phe Tyr Lys Thr Val Ala Tyr Gly Arg Ile Tyr Phe Asn Glu Tyr Gln		
130	135	140
		25
ttc atg tat gct ttc tat gct gcg att att cag cgc tct gat acc aca	483	
Phe Met Tyr Ala Phe Tyr Ala Ala Ile Ile Gln Arg Ser Asp Thr Thr		
145	150	155
		30
155		
gga atc gtc tta cca gct cca tat gaa ctg tat cct gaa tat ttc ttg	531	
Gly Ile Val Leu Pro Ala Pro Tyr Glu Leu Tyr Pro Glu Tyr Phe Leu		
160	165	170
		35
170		
aac atg tat acg atc caa aga atg tac cga aca cag atg caa agt ggt	579	
Asn Met Tyr Thr Ile Gln Arg Met Tyr Arg Thr Gln Met Gln Ser Gly		
175	180	185
		40
185		
ata ttc aat gag gaa gtt gct agt aac tat ggt atc tgg aag atg gat	627	
Ile Phe Asn Glu Glu Val Ala Ser Asn Tyr Gly Ile Trp Lys Met Asp		
190	195	200
		45
200		
aat aac tac tat tat tac tac aac tac tct aat ccc ttg acg tac aga	675	
Asn Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Tyr Ser Asn Pro Leu Thr Tyr Arg		
210	215	220
		50
220		
aat cag gag tac aga ttg tct tat ttg aca gaa gac ata ggc tgg aac	723	
Asn Gln Glu Tyr Arg Leu Ser Tyr Leu Thr Glu Asp Ile Gly Trp Asn		
225	230	235
		55
235		
tct tac tat tac tac ttc cac aat ctt atg cct ttc tgg ggc aaa ggc	771	
Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Phe His Asn Leu Met Pro Phe Trp Gly Lys Gly		
240	245	250
		60
250		
		65

DE 100 41 541 A 1

DE 100 41 541 A 1

tac aag gaa tgg ttg gag ccc tat gat caa gag gta ctt cac tac tcc	1395	
Tyr Lys Glu Trp Leu Glu Pro Tyr Asp Gln Glu Val Leu His Tyr Ser		
450	455	460
		5
ggt gtc aag atc aat gac gtc agt gtt ggt aac ttg act acc ttc ttc	1443	
Gly Val Lys Ile Asn Asp Val Ser Val Gly Asn Leu Thr Thr Phe Phe		
465	470	475
		10
gag tac tat gac ttc aac gcc acc aat gca gtt ttc tta agt gac caa	1491	
Glu Tyr Tyr Asp Phe Asn Ala Thr Asn Ala Val Phe Leu Ser Asp Gln		
480	485	490
		15
gag att caa caa caa tat tct tca ttc atc gta cgt caa ccg cgt ttg	1539	
Glu Ile Gln Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Ile Val Arg Gln Pro Arg Leu		
495	500	505
		20
aac cac gaa cct ttc tcc gtg acc atc gat gtt aag tct gac gtt gag	1587	
Asn His Glu Pro Phe Ser Val Thr Ile Asp Val Lys Ser Asp Val Glu		
510	515	520
		25
525		
gcg gaa gcg tac ttc aag atc ttt gtt ggt cct aaa tat gat gga gaa	1635	
Ala Glu Ala Tyr Phe Lys Ile Phe Val Gly Pro Lys Tyr Asp Gly Glu		
530	535	540
		30
ggt cgc cct ctt agc ttg gaa gat aac tgg atg aac ttc gtg gaa ttg	1683	
Gly Arg Pro Leu Ser Leu Glu Asp Asn Trp Met Asn Phe Val Glu Leu		
545	550	555
		35
555		
gac tgg ttc acc cac aaa ttg acg tca gga cag aac aag gtt gag cgc	1731	
Asp Trp Phe Thr His Lys Leu Thr Ser Gly Gln Asn Lys Val Glu Arg		
560	565	570
		40
570		
aaa tct gag gaa ttc ttc ttc ttt aaa gag gac tcc gtc tca atg tct	1779	
Lys Ser Glu Glu Phe Phe Phe Lys Glu Asp Ser Val Ser Met Ser		
575	580	585
		45
585		
aag atc tat gaa ctc ctg aaa cag ggc cag gta cct gaa agc atg tcc	1827	
Lys Ile Tyr Glu Leu Leu Lys Gln Gly Gln Val Pro Glu Ser Met Ser		
590	595	600
		50
600		
605		
gaa gac tac gac tct atg cca agc aga ctg atg ttg ccc aga ggc act	1875	
Glu Asp Tyr Asp Ser Met Pro Ser Arg Leu Met Leu Pro Arg Gly Thr		
610	615	620
		55
620		
ccg ggt ggt ttc cct gta cag ttc ttc gtc ttc gtg tac cca tac caa	1923	
Pro Gly Gly Phe Pro Val Gln Phe Phe Val Phe Val Tyr Pro Tyr Gln		
625	630	635
		60
635		
		65

DE 100 41 541 A 1

gct ctc agc aaa gac cta gag gct atg aag aat atc atc ctt gac aac	1971
Ala Leu Ser Lys Asp Leu Glu Ala Met Lys Asn Ile Ile Leu Asp Asn	
5 640 645 650	
aaa cct ttg ggc tat cca ttt gac cgt cct gtc gag tac ccg tat ctc	2019
Lys Pro Leu Gly Tyr Pro Phe Asp Arg Pro Val Glu Tyr Pro Tyr Leu	
10 655 660 665	
ttc tta caa cct aat atg tac ttt gaa gac gtc aat atc tac cac aga	2067
Phe Leu Gln Pro Asn Met Tyr Phe Glu Asp Val Asn Ile Tyr His Arg	
15 670 675 680 685	
ggc cct caa tac ccc tgg tgg agt aat ggc caa ttc cgt ctg aat gaa	2115
Gly Pro Gln Tyr Pro Trp Trp Ser Asn Gly Gln Phe Arg Leu Asn Glu	
20 690 695 700	
gta cct aga caa taaaggagag agaaaagagtt cttgaaccaa aacatttaaa	2167
25 Val Pro Arg Gln	
705	
30 gctagtagaa cactatagtc acaataaaat aaaaattttt atagtaaaaa aaaaaaaaaa 2227	
aaa	2230
35 <210> 6	
<211> 705	
<212> PRT	
40 <213> <i>Plodia interpunctella</i>	
<400> 6	
Met Lys Thr Val Leu Ile Leu Ala Gly Leu Val Ala Leu Ala Ala Gly	
45 1 5 10 15	
Asn Thr Phe Pro Val Phe Arg Tyr Asp His Val Glu Thr Arg Lys Leu	
50 20 25 30	
Glu Gly Asp Leu Leu Gln Tyr Gln Ser Lys Phe Leu Ser Leu Leu Glu	
55 35 40 45	
Asn Val Arg Gln Ile Asp Tyr Glu Ala Glu Tyr Tyr Lys Val Gly Lys	
60 50 55 60	
Gly Tyr Asp Ile Val Ala Ser Ile Glu Asn Tyr Ser Asp Gln Asp Ala	
65 65 70 75 80	
Val Arg Ala Phe Ala Gly Leu Arg Glu Ile Gly Phe Met Pro Lys Ala	
65	

DE 100 41 541 A 1

85	90	95	
Tyr Thr Phe Ser Ile Phe Tyr Asp Arg Gln Arg Glu Glu Ala Lys Ile			
100	105	110	5
Ile Tyr Asp Leu Phe Tyr Ser Ala Lys Asp Leu Asp Thr Phe Tyr Lys			
115	120	125	10
Thr Val Ala Tyr Gly Arg Ile Tyr Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Met Tyr			
130	135	140	
Ala Phe Tyr Ala Ala Ile Ile Gln Arg Ser Asp Thr Thr Gly Ile Val			
145	150	155	15
Leu Pro Ala Pro Tyr Glu Leu Tyr Pro Glu Tyr Phe Leu Asn Met Tyr			
165	170	175	20
Thr Ile Gln Arg Met Tyr Arg Thr Gln Met Gln Ser Gly Ile Phe Asn			
180	185	190	25
Glu Glu Val Ala Ser Asn Tyr Gly Ile Trp Lys Met Asp Asn Asn Tyr			
195	200	205	30
Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Tyr Ser Asn Pro Leu Thr Tyr Arg Asn Gln Glu			
210	215	220	
Tyr Arg Leu Ser Tyr Leu Thr Glu Asp Ile Gly Trp Asn Ser Tyr Tyr			
225	230	235	35
240			
Tyr Tyr Phe His Asn Leu Met Pro Phe Trp Gly Lys Gly Glu Asp Phe			
245	250	255	40
Ile Gly Ile Phe Lys Glu Arg Arg Gly Glu Phe Tyr Tyr Phe Tyr			
260	265	270	45
Gln Gln Leu Leu Ser Arg Tyr Tyr Leu Glu Arg Leu Ser Asn Gly Leu			
275	280	285	50
Gly Glu Ile Pro Asp Phe Ser Trp Tyr Gln Pro Leu Arg Ser Gly Tyr			
290	295	300	55
Tyr Pro Ala Ile Tyr Thr Ser Ser Ala Tyr Pro Phe Ala Gln Arg Pro			
305	310	315	60
320			
Asn Tyr Tyr Tyr Met Gly Thr Glu Glu Asn Val Asp Tyr Ile Gln Phe			
325	330	335	
Leu Asp Ala Gln Glu Lys Ser Phe Val Gln Phe Leu Gln Ile Gly Gln			65

DE 100 41 541 A 1

340

345

350

5 Phe Lys Ala Phe Lys Gln Asp Val Asp Phe Arg Asn Ser Lys Ser Ile
 355 360 365
 10 Asn Phe Val Gly Asn Phe Trp Gln Gly Asn Pro Asp Leu Tyr Asp Lys
 370 375 380
 15 Tyr Gly Arg Glu Val Asn Tyr Asp Asp Ser Tyr Glu Ile Ile Ala Arg
 385 390 395 400
 20 Arg Val Leu Gly Ala Ala Pro Pro Thr Ser Asp Asn Tyr Glu Phe Val
 405 410 415
 25 Pro Ser Ala Leu Asp Phe Tyr Gln Thr Ser Leu Arg Asp Pro Ala Phe
 420 425 430
 30 Tyr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Met Ser Tyr Ile Val Gln Tyr Lys Glu
 435 440 445
 35 Trp Leu Glu Pro Tyr Asp Gln Glu Val Leu His Tyr Ser Gly Val Lys
 450 455 460
 40 Ile Asn Asp Val Ser Val Gly Asn Leu Thr Thr Phe Phe Glu Tyr Tyr
 465 470 475 480
 45 Asp Phe Asn Ala Thr Asn Ala Val Phe Leu Ser Asp Gln Glu Ile Gln
 485 490 495
 50 Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Ile Val Arg Gln Pro Arg Leu Asn His Glu
 500 505 510
 55 Pro Phe Ser Val Thr Ile Asp Val Lys Ser Asp Val Glu Ala Glu Ala
 515 520 525
 60 Tyr Phe Lys Ile Phe Val Gly Pro Lys Tyr Asp Gly Glu Gly Arg Pro
 530 535 540
 65 Leu Ser Leu Glu Asp Asn Trp Met Asn Phe Val Glu Leu Asp Trp Phe
 545 550 555 560
 70 Thr His Lys Leu Thr Ser Gly Gln Asn Lys Val Glu Arg Lys Ser Glu
 565 570 575
 75 Glu Phe Phe Phe Lys Glu Asp Ser Val Ser Met Ser Lys Ile Tyr
 580 585 590
 80 Glu Leu Leu Lys Gln Gly Gln Val Pro Glu Ser Met Ser Glu Asp Tyr

DE 100 41 541 A 1

595	600	605	
Asp Ser Met Pro Ser Arg Leu Met Leu Pro Arg Gly Thr Pro Gly Gly			
610	615	620	5
Phe Pro Val Gln Phe Phe Val Phe Val Tyr Pro Tyr Gln Ala Leu Ser			
625	630	635	10
Lys Asp Leu Glu Ala Met Lys Asn Ile Ile Leu Asp Asn Lys Pro Leu			
645	650	655	
Gly Tyr Pro Phe Asp Arg Pro Val Glu Tyr Pro Tyr Leu Phe Leu Gln			15
660	665	670	
Pro Asn Met Tyr Phe Glu Asp Val Asn Ile Tyr His Arg Gly Pro Gln			20
675	680	685	
Tyr Pro Trp Trp Ser Asn Gln Phe Arg Leu Asn Glu Val Pro Arg			25
690	695	700	
Gln			
705			30
<210> 7			35
<211> 1076			
<212> DNA			
<213> <i>Plodia interpunctella</i>			40
<220>			
<221> CDS			
<222> (73)..(834)			45
<400> 7			
taactgttat tgctcagtga taatagatta gttattataat tgtcaagaag ctgatacgtt 60			
tgcaaaatca tc atg aat ttc gcc ggt aaa gtt gta att gta acc ggt gct 111			50
Met Asn Phe Ala Gly Lys Val Val Ile Val Thr Gly Ala			
1	5	10	
agc tcc ggt att gga gca gct aca gct gtg ttc cta tcg aaa cta ggc 159			
Ser Ser Gly Ile Gly Ala Ala Thr Ala Val Phe Leu Ser Lys Leu Gly			
15	20	25	55
gct aag ctt tct ctg acg gga cgt aac gtc gag aat ctt aag aaa gtt 207			
Ala Lys Leu Ser Leu Thr Gly Arg Asn Val Glu Asn Leu Lys Lys Val			
30	35	40	60
45			65

DE 100 41 541 A 1

agt cag gat tgc gaa aaa tcc acc cag aca cac tac atc gcc gcc gac	255
Ser Gln Asp Cys Glu Lys Ser Thr Gln Thr His Tyr Ile Ala Ala Asp	
5 50 55 60	
tta acc aaa gaa aaa gat att gaa aat atc gtt aaa agc acc att gat	303
Leu Thr Lys Glu Lys Asp Ile Glu Asn Ile Val Lys Ser Thr Ile Asp	
10 65 70 75	
aaa tac ggc caa ctt gac gtc ctg gtc aat aat gct ggc att ctt gag	351
Lys Tyr Gly Gln Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Leu Glu	
15 80 85 90	
act ggt tcc atc gaa aac ac _a tcg tta gcc cag tac gac agg tta atg	399
Thr Gly Ser Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Arg Leu Met	
20 95 100 105	
aat aca aat gtg cgc tca att tat tac tta acc atg ctg gca gtc cca	447
Asn Thr Asn Val Arg Ser Ile Tyr Tyr Leu Thr Met Leu Ala Val Pro	
25 110 115 120 125	
cac ctt ctc aaa acc aaa ggt aac att gtg aat gta tct agt gtc aat	495
His Leu Leu Lys Thr Lys Gly Asn Ile Val Asn Val Ser Ser Val Asn	
30 130 135 140	
ggg atc agg tct ttc cct ggt gta ctg gct tac aat gtt tcg aag tca	543
Gly Ile Arg Ser Phe Pro Gly Val Leu Ala Tyr Asn Val Ser Lys Ser	
35 145 150 155	
gct gta gat cag ttt aca aga tgt gtt gca ctt gaa ttg gcc ccg aaa	591
Ala Val Asp Gln Phe Thr Arg Cys Val Ala Leu Glu Leu Ala Pro Lys	
40 160 165 170	
ggg gta cga gtt aat tgt gtg aat cca gga gtc att ttg aca gaa ctg	639
Gly Val Arg Val Asn Cys Val Asn Pro Gly Val Ile Leu Thr Glu Leu	
45 175 180 185	
cag aag cgt ggg ggt ttg aac gac cag cag tat gca gca ttt ctg gag	687
Gln Lys Arg Gly Gly Leu Asn Asp Gln Gln Tyr Ala Ala Phe Leu Glu	
50 190 195 200 205	
aga acc aag gag aca cat gcc ttg ggc cgg ccg gga aaa ccg gag gag	735
Arg Thr Lys Glu Thr His Ala Leu Gly Arg Pro Gly Lys Pro Glu Glu	
55 210 215 220	
gtt gca gct act att gct ttc ttg gcc agt gaa tta gca agc aat atc	783
Val Ala Ala Thr Ile Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Ala Ser Asn Ile	
60 225 230 235	

DE 100 41 541 A 1

act gga gcc agt gtg cct gta gac ggt ggt cgc cat gcc atg tgt cca 831
Thr Gly Ala Ser Val Pro Val Asp Gly Gly Arg His Ala Met Cys Pro
240 245 250

cga taatttttt aataaaatac atgttaattt ttttttact atttacaatt 884
Arg

tttcaatcca agcattttac aatgatcaaa gtgtctaaaa cctttqaat attgtacaat 944

aaaatttta tatattatag attaagtaaa aacgttcata tacctataat ttgtgtcata 1004

tggatgtcca tgtgttcata tattttgtta taacctgtt attttaaaat aaaaacaaat 1064

aataaaaaaa aa 1076

<210> 8

<211> 254

212 PBT

<213> *Plodia interpunctella*

<400> 8

Met Asn Phe Ala Gly Lys Val Val Ile Val Thr Gly Ala Ser Ser Gly
1 5 10 15

Ile Gly Ala Ala Thr Ala Val Phe Leu Ser Lys Leu Gly Ala Lys Leu
20 25 30

Ser Leu Thr Gly Arg Asn Val Glu Asn Leu Lys Lys Val Ser Gln Asp
35 40 45

Cys Glu Lys Ser Thr Gln Thr His Tyr Ile Ala Ala Asp Leu Thr Lys
50 55 60

Glu Lys Asp Ile Glu Asn Ile Val Lys Ser Thr Ile Asp Lys Tyr Gly
65 70 75 80

Gln Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Leu Glu Thr Gly Ser
85 90 95

Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Arg Leu Met Asn Thr Asn
100 105 110

Val Arg Ser Ile Tyr Tyr Leu Thr Met Leu Ala Val Pro His Leu Leu
115 120 125

Lys Thr Lys Gly Asn Ile Val Asn Val Ser Ser Val Asn Gly Ile Arg

130	135	140	
5 Ser Phe Pro Gly Val Leu Ala Tyr Asn Val Ser Lys Ser Ala Val Asp			
145	150	155	160
10 Gln Phe Thr Arg Cys Val Ala Leu Glu Leu Ala Pro Lys Gly Val Arg			
165	170	175	
15 Val Asn Cys Val Asn Pro Gly Val Ile Leu Thr Glu Leu Gln Lys Arg			
180	185	190	
20 Gly Gly Leu Asn Asp Gln Gln Tyr Ala Ala Phe Leu Glu Arg Thr Lys			
195	200	205	
25 Glu Thr His Ala Leu Gly Arg Pro Gly Lys Pro Glu Glu Val Ala Ala			
210	215	220	
30 Thr Ile Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Ala Ser Asn Ile Thr Gly Ala			
225	230	235	240
35 Ser Val Pro Val Asp Gly Gly Arg His Ala Met Cys Pro Arg			
245	250		

Patentansprüche

- 35 1. Nukleinsäure, kodierend für ein allergenes Polypeptid, umfassend
 - (a) eine der in SEQ ID No. 1, 3, 5 oder 7 dargestellten Sequenzen oder ein Fragment davon, welches für eine allergene Determinante davon kodiert,
 - (b) eine von einer Sequenz gemäß (a) auf Grund der Degeneration des genetischen Codes abweichende Sequenz,
 - (c) eine Sequenz mit einer Identität > 80% zu einer der Sequenzen von (a) oder/und (b) oder
 - (d) eine Sequenz, die mit einer der Sequenzen gemäß (a), (b) oder/und (c) unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
- 40 2. Nukleinsäure, umfassend einen Bereich, der für ein Polypeptid mit einer SEQ ID No. 2, 4, 6 oder 8 dargestellten Sequenz kodiert.
- 45 3. Rekombinantes DNA-Molekül, das (a) eine Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenizität der Allergene p40 mit der Aminosäuresequenz in der SEQ ID No. 2, p33 mit der Aminosäuresequenz in der SEQ ID No. 4, p84 mit der Aminosäuresequenz in der SEQ ID No. 6 oder p27 mit der Aminosäuresequenz in der SEQ ID No. 8 besitzt und aus Arthropoden abgeleitet ist, oder (b) eine Nukleotidsequenz, die mit einer Nukleotidsequenz (a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert, aufweist.
- 50 4. Rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1-3, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein Polypeptid kodiert, das eine antigene Kreuzreakтивität und eine Identität > 50% mit dem p40 Allergen, dem p33 Allergen, dem p84 Allergen oder dem p27 Allergen oder ihren Homologen aus anderen Arthropoden besitzt.
- 55 5. Vektor, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4 in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz.
- 60 6. Rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem, die eine Expressionskontrollsequenz besitzen, die operativ mit einem rekombinanten Molekül wie in Anspruch 3 oder 4 beschrieben, verknüpft ist.
- 65 7. Rekombinanter Expressionsvektor, der eine Expressionskontrollsequenz besitzt, die funktionell mit einer Nukleotidsequenz verknüpft ist, die unter stringenten Bedingungen mit einer Nukleotidsequenz hybridisiert, wie sie in SEQ ID Nos. 1, 3, 5 oder 7 angegeben ist.
8. Zelle, transformiert mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4 oder einem Vektor nach einem der Ansprüche 5-7.
9. Allergenes Polypeptid, kodiert durch eine der Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1-4.
10. Polypeptid nach Anspruch 9 mit einer in SEQ ID No. 2, 4, 6, oder 8 dargestellten Aminosäuresequenz oder allergene Fragmente davon.
11. Polypeptid, das mit einem Polypeptid nach Anspruch 9 oder 10, insbesondere mit einem Polypeptid der SEQ ID No. 2, 4, 6 oder 8 immunologisch kreuzaktiv ist.
12. Polypeptid nach einem der Ansprüche 9-11, dadurch gekennzeichnet, dass es mit einem heterologen Peptid

DE 100 41 541 A 1

oder Polypeptid fusioniert ist.

13. Ein Polypeptid nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das heterologe Peptid oder Polypeptid eine zellulosebindende Domäne, β -Galaktosidase oder Glutathion S-Transferase ist.

14. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 9-13 oder von Fragmenten eines solchen Polypeptids als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern.

15. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 9-13.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:

- (a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4,
- (b) einen rekombinanten Vektor nach einem der Ansprüche 5-7,
- (c) eine Zelle nach Anspruch 8,
- (d) ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 9-13 oder/und
- (e) einen Antikörper nach Anspruch 15.

17. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 16 zur Herstellung eines diagnostischen und/oder therapeutischen Mittels.

18. Verwendung nach Anspruch 17 für die Therapie oder/und Diagnose von allergischen Erkrankungen.

19. Verfahren zur Diagnose, bevorzugt *in vitro*, einer Allergie gegen Arthropodenproteine, wobei man eine Probe einer Körperflüssigkeit aus dem Patienten, in der Antikörper gegen das Arthropodenprotein vermutet werden, mit einem Polypeptid nach Anspruch 6-13 unter Bedingungen in Kontakt bringt, die die Bildung eines Komplexes zwischen dem Antikörper und dem Polypeptid ermöglichen, wonach der Komplex gemessen wird und zu der Menge des Antikörpers in der Probe in Beziehung gesetzt wird, wobei ein erhöhter Spiegel als Zeichen einer Allergie gegen das Arthropodenprotein gewertet wird, die das Polypeptid enthält.

20. Verfahren zur Messung, vorzugsweise *in vitro*, einer zellulären Immunreaktion, wobei ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 9-13 zur Stimulation der zellulären Immunreaktion verwendet wird.

21. Verfahren zur Bestimmung von Arthropodenallergenen in Proben aus der Umwelt des Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Argininkinaseaktivität (EC 2.7.3.3) in den Proben bestimmt.

22. Verfahren zur Bestimmung von Arthropodenallergenen in Proben aus der Umwelt des Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass man das Vorhandensein einer Nukleinsäure nach Anspruch 1-4 oder eines allergene Polypeptids nach Anspruch 9-13 bestimmt.

23. Verfahren zur Bestimmung von Arthropodenallergenen in Proben aus der Umwelt des Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass man das Vorhandensein der Allergene p40, p33, p84 oder p27 oder ihrer Homologen bestimmt.

24. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man das Vorhandensein eines p40 Homologen aus Milbe oder Motte bestimmt.

25. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das ein synthetisches oder rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 9-13 enthält und zur Hyposensibilisierung (Immuntherapie) von Patienten mit Allergie gegen p40, p33, p84 oder p27 oder ihrer Homologen eingesetzt werden kann.

26. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels für die passive oder aktive Immuntherapie, das solche Fragmente oder Teilpeptide des Polypeptids der Erfindung enthält, die zwar ein Epitop oder mehrere Epitope, insbesondere IgE, IgG oder IgA-Epitope, des p40, des p33, des p84, oder des p27 Allergens oder ihrer Homologen umfassen, aber nicht oder nur in einem stark eingeschränkten Maß zu einer anaphylaktischen Reaktion führen können.

27. Verwendung einer Argininkinase zur Herstellung eines Arzneimittels oder/und eines diagnostischen Mittels zur Behandlung von allergischen Erkrankungen oder/und zur Bestimmung von Allergenen.

28. Verwendung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass eine Argininkinase aus einer Motte oder aus einer Milbe verwendet oder bestimmt wird.

29. Verfahren zum Nachweis einer Allergie, bei dem die Dörrrobstmotte, Extrakte davon oder einzelne Bestandteile davon zur Bestimmung der Allergie eingesetzt werden.

30. Allergen, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Argininkinase handelt.

31. Allergen nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Argininkinase aus einer Motte oder einer Milbe handelt.

Hierzu 11 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

H1 - H45

kDa

97 ←
66 ←
46 ←30 ←
21 ←46 ←
30 ←**H46 - H90**

K

kDa

97 ←
66 ←
46 ←30 ←
21 ←46 ←
30 ←

Fig. 1

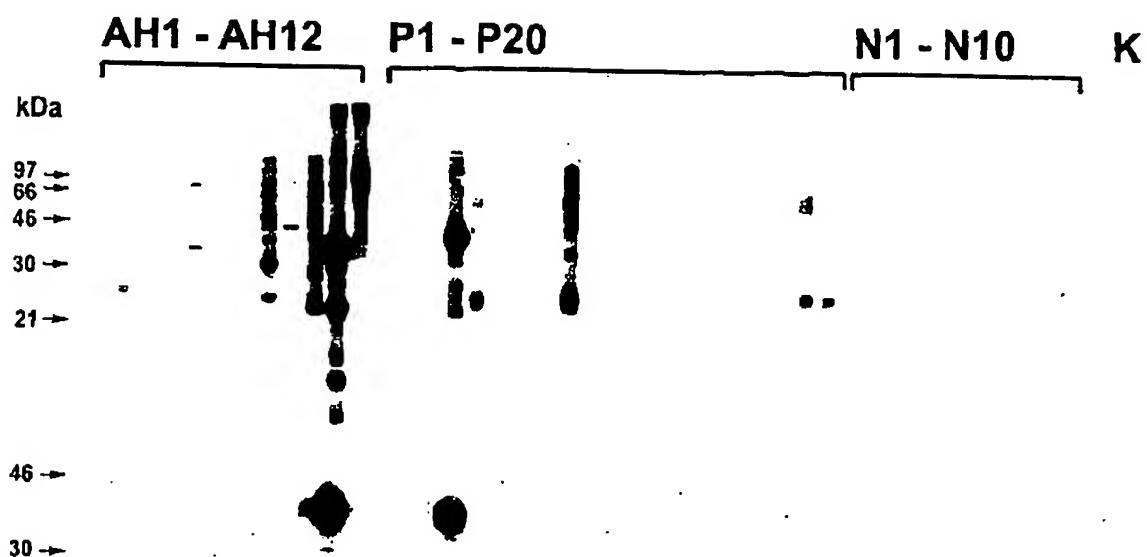


Fig. 2

Fig. 3

1 TCAAGTGTCAAGAAAAGCAGCAGCA
 25 ATGGTGGACGCCGCTACCCCTGAGAAAATTGGAGGCTGGCTTCAGCAAGCTTGCCGCCCTCC
 1 M V D A A T L E K L E A G F S K L A A S
 85 GACTAAAGTCGCTGCTGAAGAAATACCTCACCAAGGGAGGTATTGTAGCTCTCAAGAAC
 21 D S K S L L K K Y L T R E V F D A L K N
 145 AAGAAGACCTCAATTGGTCAACTCTCTGGATTCTATCCAGTCAGGTGTTGAGAACCTTA
 41 K K T S F G S T L L D S I Q S G V E N L
 205 CATTGGGTGTTGGAATTATGCCCGATGCTGAGGCATATGTAGTATTGAGACTTG
 61 H S G V G I Y A P D A E A Y V V F A D L
 265 TTCGACCCCATCATTGAAGATTACCACAATGGCTCAAGAAAACCGACAAGCACCCCTCCC
 81 F D P I I E D Y H N G F K K T D K H P P
 325 AAGAACTGGGGAGATGTTGAGACCCCTGGGAACCTGGATCTGCTGGTGAATTGTTGTC
 101 K N W G D V E T L G N L D P A G E F V V
 385 TCCACCCGTGTCGCTGGCTCCATGGAAAGGCTACCCATTCAACCCCTGCTTAACA
 121 S T R V R C G R S M E G Y P F N P C L T
 445 GAGGCCAAATACAAGGAAATGGAAGAGAAAAGTCTCCTCCACACTCTCCGGCTCGAGGGT
 141 E A Q Y K E M E E K V S S T L S G L E G
 505 GAACTGAAAGGCACCTTTTCCACTCACAGCATGTCCAAGGAGACTCAACACAGTTG
 161 E L K G T F F P L T G M S K E T Q Q Q L
 565 ATTGATGACCAACTTCTGTTCAAGGAGGGTGATCGCTTCCCTCAGGCCGCTAACGCTTGC
 181 I D D H F L F K E G D R F L Q A A N A C
 625 CGCTTCTGGCCCTCCGGTCTGGCATCTACCAATGAGAACAAAGACTTTCTGGTATGG
 201 R F W P S G R G I Y H N E N K T F L V W
 685 TGCATGAGGAGGACCCCTCCGCTCTGATCTCATGCAAATGGCGGCACCTGAAGCAG
 221 C N E E D H L R L I S M Q M G G D L K Q
 745 GTGTACAAGAGGCTGGTGAAGGGAGTGAACGACATCGGAAGAGGATCCCAATTCTGCAC
 241 V Y K R L V R G V N D I A K R I P F S H
 805 AACGAGCGCTGGCTTCTGACTTTCTGCCCCACCAACCTGGCACAACGGTGCAC
 261 N E R L G F L T F C P T N L G T T V R A
 865 TCGGTGACATCAAGCTGCCAAGCTGGCGGCCACAAGGCCAGCTGGAGGAGGTGGCC
 281 S V H I K L P K L A A D K A K L E E V A
 925 AGCAAGTACCACTGCAGGTGCGCGCACCCGCCAGACACGGAGGCCAGGGCGCC
 301 S K Y H L Q V R G T R G E H T E A E G G
 985 GTCTACGACATCTCAAACAGAGGCGCATGGACTACCGAGTACGAAGCCGCAAGGAG
 321 V Y D I S N K R R M G L T E Y E A V K E
 1045 ATGTACGACGGCATCGCTGAACGTGATCAAAATCGAGAAATCCCTGTAAGATTTAACGA
 341 M Y D G I A E L I K I E K S L *
 1105 TCTCGCCTATCAGTATTTTGATTATTCAGCTTACATAAGTATTGGATGTGAA
 1165 GGGCGAGGGCGACACTAGTCAGCGCTTGAAGCGGGCGGGCACGCGGGCGCCACT
 1225 ATACTGTTCGTAAAGTATTGTCTATAAGGAAATGGAAAATAAGACAGCTAGCGTTAA
 1285 GACAAAAAAA

Fig. 4

1 ACAGGACAGTAGACACACAAAGCCACCAACCATTGGACGGCATCAAGAAGAAGATGCAGGCG
 2 M D A I K K K M Q A
 61 ATGAAGCTGGAGAAGGACAACGTTTGGACCGCGCTGCCATGTGCGAGCAGCAGGCCAAG
 11 M K L E K D N A L D R A A M C E Q Q A K
 121 GACGCCAACCTCCGTGCTGAGAAGGCCGAGGAGGAGGCCAGACAATTGCAGAAGAAGATC
 31 D A N L R A E K A E E E A R Q L Q K K I
 181 CAGACGATTGAGAACGATCTGGACCAGACGCAGGAGGCCGCTCATGCAGGTCAACGCCAAG
 51 Q T I E N D L D Q T Q E A L M Q V N A K
 241 CTGGAAGAGAAAGAGAAAGCTCTTCAGAACGCTGAGTCCGAAGTCGCTGCCCTAACCGA
 71 L E E K E K A L Q N A E S E V A A L N R
 301 CGTATCCAATCTGCTGGAAGAGGCCCTCGAGAGGTCCGAGGCCCTGCCAACCGCCACA
 91 R I Q L L E E D L E R S E E R L A T A T
 361 GCCAAACTGTCGAAGCCAGGCCAGGCTGCCATGAGTCGGAACGTGCCGCAAGGTGCTC
 111 A K L S E A S Q A A D E S E R A R K V L
 421 GAGAACAGGTCAATTGGCTGATGAAGAGCGTATGGACGCTTGGAGAACCGAGCTGAAGGAA
 131 E N R S L A D E E R M D A L E N Q L K E
 481 GCCAGGTTCCCTGCTGAGGAAGGCCAGAACAGAACATACGATGAGGTGCTCGTAAGCTGGCC
 151 A R F L A E E A D K K Y D E V A R K L A
 541 ATGGTTGAGGCTGACCTGGAGCGCGCGAGGAGCGTGGCAATCCGGCGAATCCAAAATC
 171 M V E A D L E R A E E R A E S G E S K I
 601 GTCGAGCTTGAGGAAGAAACTGCGCGTGGTGGCAACAACTTGAAATCCCTGGAAGTCTCC
 191 V E L E E L R V V G N N L K S L E V S
 661 GAGGAGAAGGCCAACCAACGTGAGGAGGAGTACAAAATCAGATCAAACCTCACCA
 211 E E K A N Q R E E E Y K N Q I K T L T T
 721 CGCCTAAAGGAGGCTGAGGCCCGCGTGGTGGCTGAGTCGCGAGCGTCCGTGCAGAAACTGCAA
 231 R L K E A E A R A E F A E R S V Q K L Q
 781 AAGGAGGTGACAGGCTTGAAGACGAACGGTGGCTGAGAAGGAGAAATACAAAGATATT
 251 K E V D R L R D E L V A E K E K Y K D I
 841 GGTGACGACCTGGACACCCCCCTCGTCGAGCTCATCCTCAAGGAATAACTCCTCACGTT
 271 G D D L D T P P V E L I L K E *
 901 GGTACACCTGGGCTGTCCATGGGGGGAGACCCACGGGTCAATTCAAGACGGCTCTT
 961 CGGCCAGCGATTCAACATCTGTACAGATGTTATATTCAATTACTCATTTAAATATT
 1021 TAAATCTATAGTTTATGGCGTATTTATTTGAGTAATATAATAATAATTATTACT
 1081 TATTTAAAAAA

Fig. 5

1 GGTGGGTGGACGATGAAGACTGTCCCTGATCTTAGCTGGCCTCGTGGCCCTGGCCGCGGGC
 1 M K T V L I L A G L V A L A A G

 61 AACACCTTCCCGTATTCAAGATATGACCACGTCGAAACTAGAAAATTGAAAGGAGACCTT
 17 N T F P V F R Y D H V B T R K L E G D L

 121 TTACAGTACCACTCGAAATTCTGTCTCTGAGAATGTGAGACAGATTGACTACGAA
 37 L Q Y Q S K F L S L L E N V R Q I D Y E

 181 GCGGAGTACTACAAAGTTGGCAAGGGTTACGACATCGTAGCCAGCATAGAGAACTATTCT
 57 A E Y Y K V G K G Y D I V A S I E N Y S

 241 GACCAAGATGCAGTCAGGGCGTTGCTGGTCTCGAGAAATTGGTTCATGCCCAAAGCT
 77 D Q D A V R A F A G L R E I G F M P K A

 301 TACACATTCTCCATTCTACCGACAGGCAGAGAGAAGAGCTAAGATTATTATGACTTG
 97 Y T F S I F Y D R Q R E E A K I I Y D L

 361 TTCTACAGCGCTAAAGATTGGACACTTCTACAAAGACTGTAGGCTACGGCGAATCTAT
 117 F Y S A K D L D T F Y K T V A Y G R I Y

 421 TTCAACGAGTATCAGTTCATGTATGCTTCTATGCTGCGATTATTCAAGGCTCTGATACC
 137 F N E Y Q F M Y A F Y A A I I Q R S D T

 481 ACAGGAATCGCTTACCGCTCCATATGAACTGTATCCTGAATATTCTTGAACATGTAT
 157 T G I V L P A P Y E L Y P E Y F L N M Y

 541 ACGATCCAAAGAATGTACCGAACACAGATGCAAAGTGGTATATTCAATGAGGAAGTTGCT
 177 T I Q R M Y R T Q M Q S G I F N E E V A

 601 AGTAACATGGTATCTGAAAGATGGATAATAACTACTATTACTACAACTACTCTAAT
 197 S N Y G I W K M D N N Y Y Y Y Y N Y S N

 661 CCCTTGACGTACAGAAAATCAGGAGTACAGATTGTCTTATTGACAGAACATAGGCTGG
 217 P L T Y R N Q E Y R L S Y L T E D I G W

 721 AACTCTTACTATTACTACTTCCACAATCTTATGCCCTTCTGGGGCAAAGGGAGGACTTT
 237 N S Y Y Y Y F H N L M P F W G K G E D F

 781 ATGGTATCTCAAGGAACGCCGTGGAGAATTCTACTACTACTTCTATCAGCAACTCTTG
 257 I G I F K E R R G E F Y Y Y F Y Q Q L L

 841 TCTCGTTACTACCTTGAGCGTTGAGTAATGGCTTGGGAGAAATTCCAGATTCTCTGG
 277 S R Y Y L E R L S N G L G E I P D F S W

 901 TACCAACCTCTGAGGAGTGGTTACTATCCAGCTATATATACGAGCTCAGCCTATCCGTT
 297 H Q P L R S G Y Y P A I Y T S S A Y P F

 961 GCTCAACGTCCCAACTATTATTACATGGAACTGAAGAAAATGGTACTACATCCAATT
 317 A Q R P N Y Y Y M G T E E N V D Y I Q F

 1021 CTTGATGCTCAGGAAAAGAGCTTGTGCAATTCTGCAGATTGCCAGTTAAGGCATT
 337 L D A Q E K S F V Q F L Q I G Q F K A F

 1081 AAACAAGATGTAGACTTCCGCAACTCCAAGTCATAAAACTTTGGTGGCAACTTTGGCAA
 357 K Q D V D F R N S K S I N F V G N F W Q

 1141 GGAAACCCGGACCTGTACGATAAGTACGGAAGGGAGTAAACTATGACGACTCCTACGAA
 377 G N P D L Y D K Y G R E V N Y D D S Y E

 1201 ATCATCGCTGCCCGCGTGTGGTGTGCTCCCTCCGACCTCCGACAAATTCAAGAATTGTG
 397 I I A R R V L G A A P P T S D N Y E F V

 1261 CCGCTGCTCTGGACTTCTACCAACTTCACCTCGTGAATCCCGCCTCTACATGCTCTAT
 417 P S A L D F Y Q T S L R D P A F Y M L Y

1321 AACAAAGATCATGAGCTACATTGTACAGTACAAGGAATGGTTGGAGCCCTATGATCAAGAG
 437 N K I M S Y I V Q Y K E W L E P Y D Q E

1381 GTACTTCACTACTCCGGTGTCAAGATCAATGACGTCAGTGTGGTAACTTGACTACCTTC
 457 V L H Y S G V K I N D V S V G N L T T F

1441 TTGAGTACTATGACTTCAACGCCACCAATGCAGTTTCTTAAGTGACCAAGAGATTCAA
 477 F E Y Y D F N A T N A V F L S D Q E I Q

1501 CAACAATATTCTTCATTCATCGTACGTCAACCGCGTTGAACCACGAACCTTTCTCCGTG
 497 Q Q Y S S F I V R Q P R L N H E P F S V

1561 ACCATCGATGTTAAGTCTGACGTTGAGGCGGAAGCGTACTTCAAGATCTTGTGGTCT
 517 T I D V K S D V E A E A Y F K I F V G P

1621 AAATATGATGGAGAAGGTGCCCCCTTTAGCTTGGAAAGATAACTGGATGAACTTCGTGGAA
 537 K Y D G E G R P L S L E D N W M N F V E

1681 TTGGACTGGTTCACCCACAAATTGACGTCAGGACAGAACAGGTTGAGCGCAATCTGAG
 557 L D W P T H K L T S G Q N K V E R K S E

1741 GAATTCTCTTCTTAAAGAGGACTCCGTCATGTCTAAGATCTATGAACACTCTGAAA
 577 E F F F F K E D S V S M S K I Y E L L K

1801 CAGGGCCAGGTACCTGAAAGCATGTCCGAAGACTACGACTCTATGCCAAGCAGACTGATG
 597 Q G Q V P E S M S E D Y D S M P S R L M

1861 TTGCCCAGAGGCACTCCGGTGGTTCCCTGTACAGTTCTCGTCTCGTGTACCCATAC
 617 L P R G T P G G F P V Q F F V F V Y P Y

1921 CAAGCTCTAGCAAAGACCTAGAGGCTATGAAGAATATCATCCTTGACAACAAACCTTG
 637 Q A L S K D L E A M K N I I L D N K P L

1981 GGCTATCCATTGACCGTCCTGTCGAGTACCGTATCTCTTCTAACACCTAATATGTAC
 657 G Y P F D R P V E Y P Y L F L Q P N M Y

2041 TTTGAAGACGTCAATATCTACCAACAGAGGCCCTCAATACCCCTGGTGGAGTAATGGCCAA
 677 F E D V N I Y H R G P Q Y P W W S N G Q

2101 TTCCGTCTGAATGAAGTACCTAGACAATAAAGGAGAGAGAAAGAGTTCTTGAAACCAAAAC
 697 F R L N E V P R Q *

2161 ATTTAAAGCTAGTAGAACACTATAGTCACAATAAAATAAAATTTTATAGAAAAAAA

2221 AAAAAAAA

Fig. 6

1 TAACTGTTATTGCTCAGTGATAATAGAATTAGTTATTATATTGTCAAGAAGCTGATAACGTT
 61 TGCAAAATCATCATGAATTTCGCCGGTAAAGTTGTAATTGTAACCGGTGCTAGCTCCGGT
 M N F A G K V V I V T G A S S G
 121 ATTGGAGCAGCTACAGCTGTGTTCTATCGAAACTAGGCGCTAAGCTTCTCTGACGGGA
 17 I G A A T A V F L S K L G A K L S L T G
 181 CGTAACGTCGAGAATCTTAAGAAAAGTTAGTCAGGATTGCGAAAAATCCACCCAGACACAC
 37 R N V E N L K K V S Q D C E K S T Q T H
 241 TACATGCCGCCACTTAACCAAAGAAAAAGATATTGAAAATATGTTAAAAGCACCATT
 57 Y I A A D L T K B K D I E N I V K S T I
 301 GATAAAATACGGCCAACCTGACGTCTGGTCATAATGCTGGCATTCTTGAGACTGGTTCC
 77 D K Y G Q L D V L V N N A G I L E T G S
 361 ATCGAAAACACATCGTTAGCCCAGTACGACAGGTTAATGAATAACAAATGTGGCTCAATT
 97 I E N T S L A Q Y D R L M N T N V R S I
 421 TATTACTTAACCATGCTGGCAGTCCCACACCTCTCAAACCAAGGTAACATTGTGAAT
 117 Y Y L T M L A V P H L L K T K G N I V N
 481 GTATCTAGTGTCAATGGGATCAGGTCTTCCCTGGTGTACTGGCTTACAATGTTTCAAG
 137 V S S V N G I R S F P G V L A Y N V S K
 541 TCAGCTGTAGATCAGTTACAAGATGTGTTGCACITGAATTGGCCCCGAAAGGGGTACGA
 157 S A V D Q F T R C V A L E L A P K G V R
 601 GTTAATTGTTGAAATCCAGGAGTCATTTGACAGAACTGCAGAAGCGTGGGGTTGAAAC
 177 V N C V N P G V I L T E L Q K R G G L N
 661 GACCAGCACTATGCAGCATTCTGGAGAGAACCAAGGAGACACATGCCCTGGGCCCG
 197 D Q Q Y A A F L E R T K B T H A L G R P
 721 GGAAAACCGGAGGAGGTTGCAAGCTACTATTGCTTCTGGCCAGTGAATTAGCAAGCAAT
 217 G K P E E V A A T I A F L A S E L A S N
 781 ATCACTGGAGCCAGTGTGCTGTAGACGGTGGTCGCCATGCCATGTGTCCACGATAATT
 237 I T G A S V P V D G G R H A M C P R *
 841 TTTTAATAAAATACATGTTAATTTTTTTACTATTACAATTTCATCAATCCAAGCATT
 901 TTACAATGATCAAAGTGTCTAAACCTTTGAATATTGTACAATAAAATTTATATAATT
 961 ATAGATTAAGTAAAAACGTTCATATAACCTATAATTGTGTCAATGGATGTCCATGTGTT
 1021 CATATAATTGTTATAACCTTGTATTAAAATAAAACAAATAATAAAAAAAA

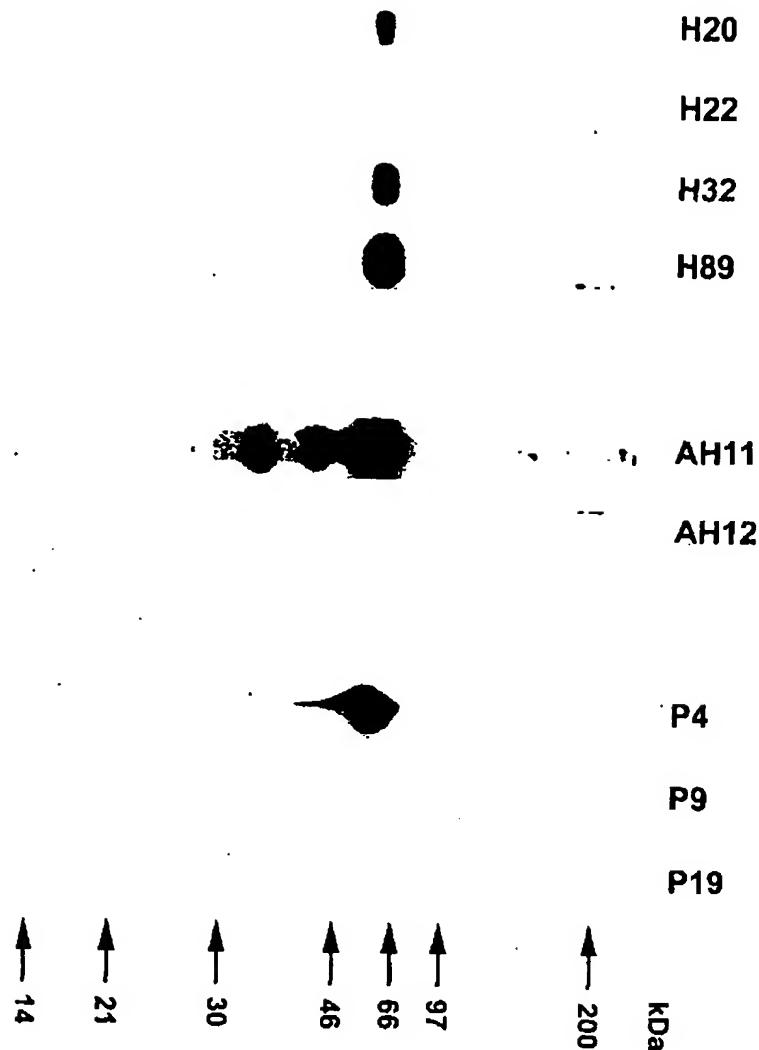


Fig. 7

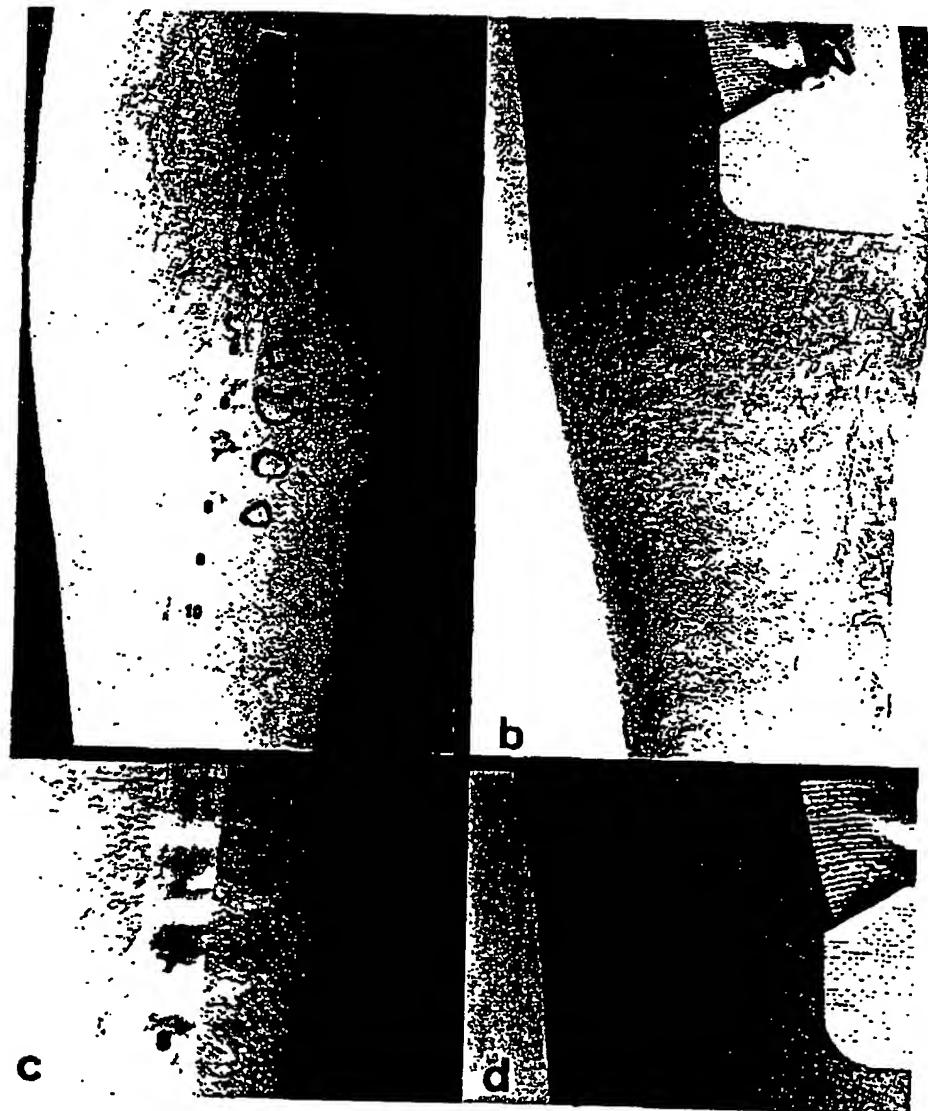


Fig. 8

BEST AVAILABLE COPY

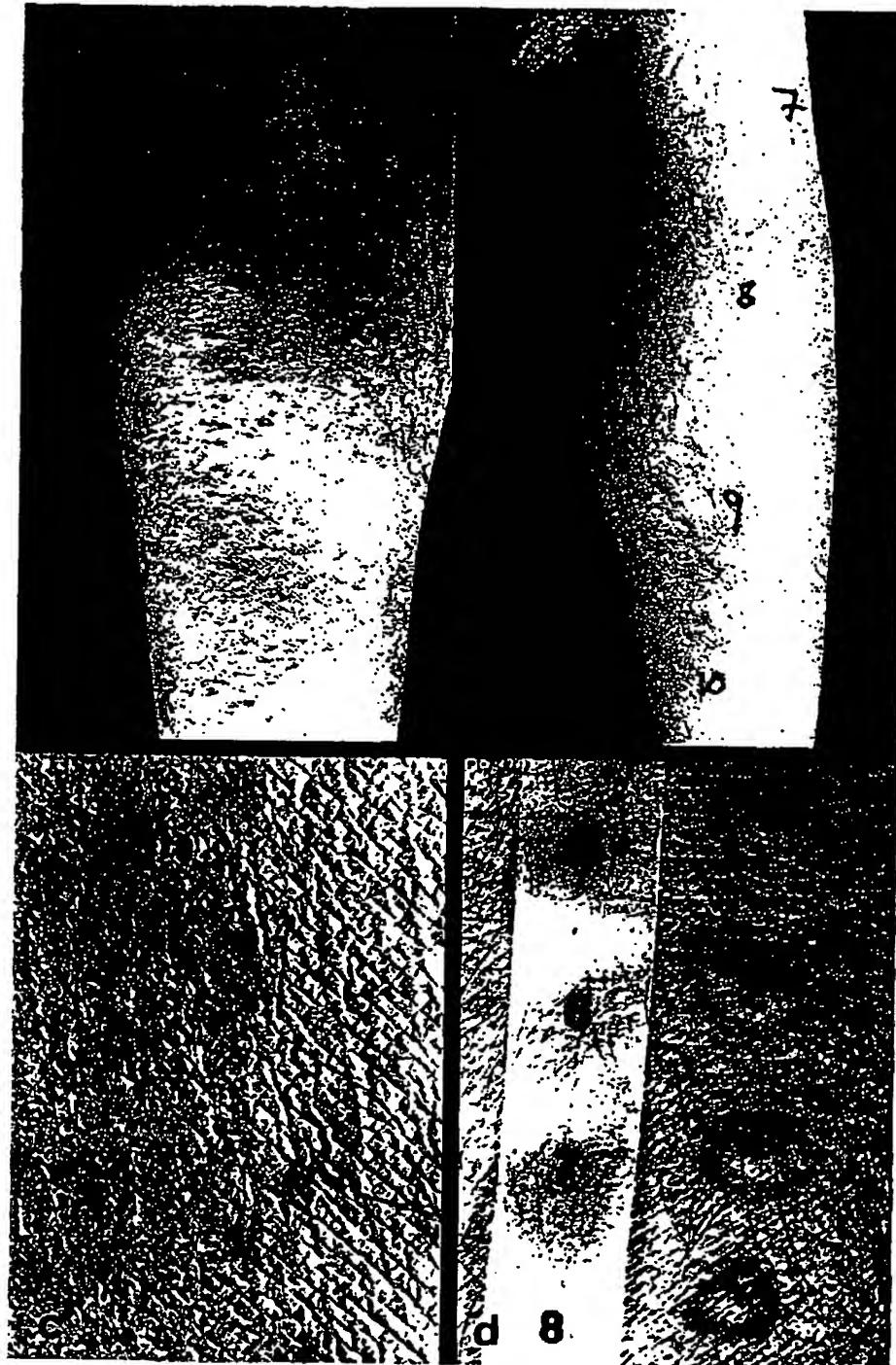


Fig. 9

BEST AVAILABLE COPY

Nummer:
Int. Cl.?:
Offenlegungstag:

DE 100 41 541 A1
C 07 K 16/00
14. März 2002

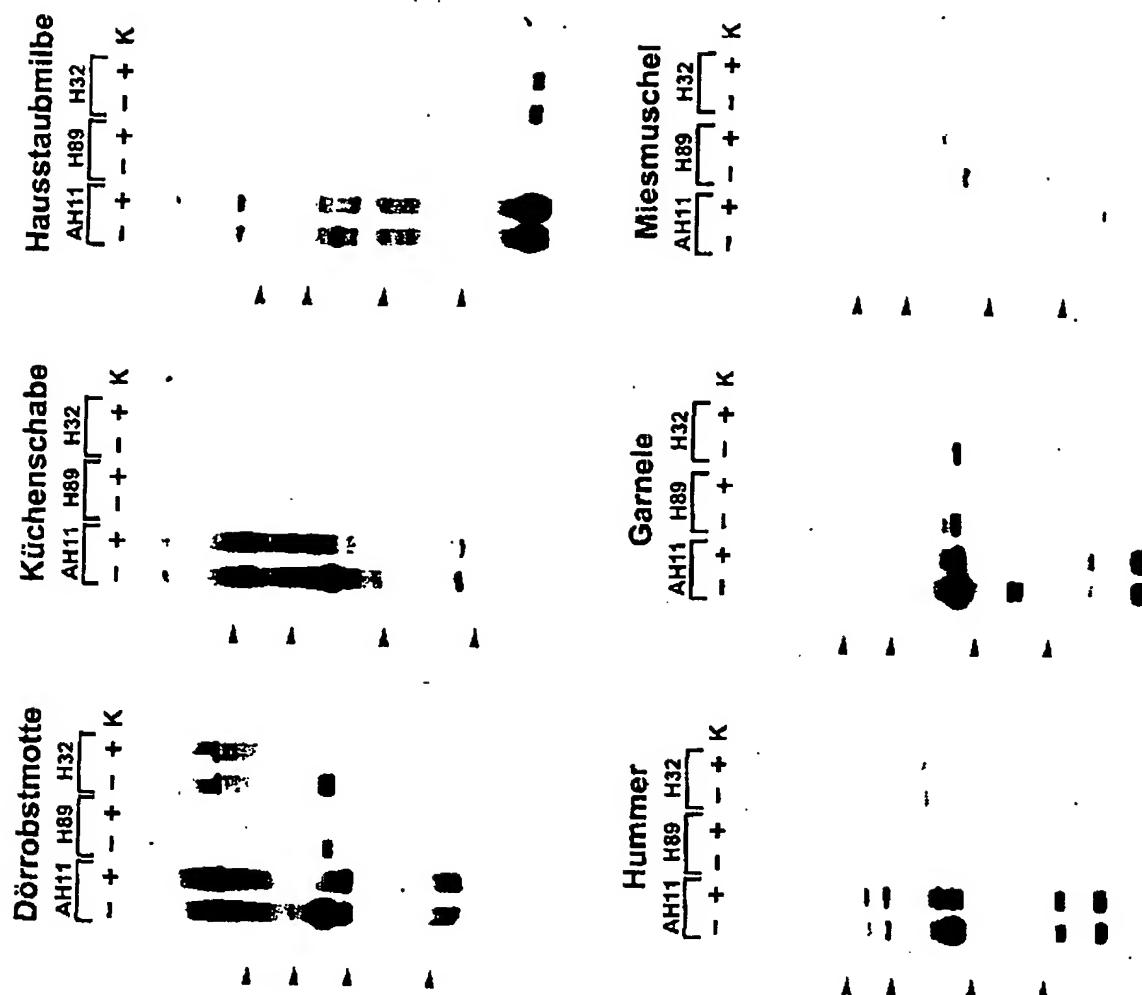


Fig. 10